

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

Bruna Eduarda Freitas Monteiro

**Avaliação de biomarcadores imunogenéticos envolvidos na leishmaniose
visceral em pacientes com HIV**

Recife

2023

Bruna Eduarda Freitas Monteiro

Avaliação de biomarcadores imunogenéticos envolvidos na leishmaniose visceral em pacientes com HIV

Dissertação de Mestrado Acadêmico apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador:

Dr^a Zulma Maria de Medeiros

Coorientador:

Dr^a Elis Dionísio da Silva

Recife

2023

Título do trabalho em inglês: Evaluation of immunogenetic biomarkers involved in visceral leishmaniasis in HIV patients.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco. (FACEPE) - Código de Financiamento 001.

M775a Monteiro, Bruna Eduarda Freitas.
Avaliação de biomarcadores imunogenéticos envolvidos na leishmaniose visceral em pacientes com HIV / Bruna Eduarda Freitas Monteiro. -- 2023.
88 p. : il.color, fotos.

Orientadora: Zulma Maria de Medeiros.
Coorientadora: Elis Dionísio da Silva.
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2023.
Bibliografia: f. 70-84.

1. Leishmaniose visceral. 2. Infecções por HIV. 3. Quimiocinas. 4. Polimorfismo genético. I. Título.

CDU 616.993.161

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

Bruna Eduarda Freitas Monteiro

**Avaliação de biomarcadores imunogenéticos envolvidos na leishmaniose
visceral em pacientes com HIV**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 27 de fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro
Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Valéria Pereira Hernandes
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr^a Zulma Maria de Medeiros
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

*Á todos os pacientes que participaram deste estudo,
à minha avó Aldeide e ao meu Deus.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por ter me permitido realizar meu sonho de passar no Mestrado do Instituto Aggeu Magalhães, o qual eu tanto me orgulho de fazer parte. Obrigada por todas as bênçãos e conquistas e por me guiar nos caminhos certos. Sem a sua ajuda, não poderia estar onde estou.

À minha orientadora Dra. Zulma Maria de Medeiros, por ter acreditado em mim quando a procurei para orientação. Possuo muito carinho e afeto, pois sou extremamente grata pelas oportunidades oferecidas, pelo aprendizado, carinho e atenção que recebi ao longo do mestrado. Muito obrigada pelas conversas e pelo cuidado de uma segunda mãe. Grata pela minha mãe científica.

À minha coorientadora Dra. Elis Dionísio da Silva, por estar comigo em todo o processo. Obrigada por me incentivar e me ajudar em todos os momentos que estive com dificuldade de suportar. Eu só tenho a agradecer a Deus, por ter colocado pessoas tão incríveis como você na minha vida. Obrigada por muito.

Ao pesquisador Dr. Walter Lins Júnior Barbosa, por sempre estar presente de alguma forma, me ajudando com ideias e sugestões. Grata pela sua ajuda no processo seletivo do Mestrado e pela sua disponibilidade e empenho em ajudar em momentos de dificuldades. Muito obrigada!

À Gilberto Silva Nunes Bezerra pelos ensinamentos e por todo o auxílio na escrita.

Aos meus amigos do Laboratório de Doenças Transmissíveis (LDT), em especial Amanda, Manuela e Neide, por dividir alegrias, fofocas, tristezas e sugestões para o desenvolvimento do meu trabalho. Essa equipe é fenomenal! Tenho muito orgulho das amizades que construí nesse processo.

À Marton Kaique por todo o auxílio na realização do ensaio de citometria.

Às minhas amigas da graduação que me acompanham até os dias de hoje, Rayana, Débora, Carol, Renata, Dani, Roberta e Liliane. Em especial a minha amiga/irmã Débora, por estar sempre comigo.

À toda equipe docente do Programa de Biociências e Biotecnologia em Saúde (BBS) pelo aprendizado e aos funcionários do Instituto Aggeu Magalhães que contribuem de alguma forma com o desenvolvimento de todos os trabalhos científicos, através de serviços na coordenação, secretaria, segurança, limpeza, esterilização, entre outros.

Aos meus colegas do BBS, Stefson e Thailany pelos momentos compartilhados de conhecimento, risadas e aflições. À Maria Eduarda Acioli, pela amizade e descontração vivenciada.

À minha família por me acompanhar e estar comigo em todos os momentos da minha vida.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

“Estejam vigilantes, mantenham-se firmes na fé,
sejam homens de coragem, sejam fortes.

Façam tudo com amor”

I Coríntios 16:13,14.

RESUMO

MONTEIRO, Bruna Eduarda Freitas. Avaliação de biomarcadores imunogenéticos envolvidos na leishmaniose visceral em pacientes com HIV. 2023. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2023.

A leishmaniose visceral (LV), quando associada ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), torna-se uma doença mais grave, com aumento na letalidade dos indivíduos acometidos, podendo ser influenciada por aspectos imunogenéticos do hospedeiro. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar biomarcadores imunogenéticos envolvidos na suscetibilidade à leishmaniose visceral em pacientes com HIV (LV/HIV) procedentes do Estado de Pernambuco. Neste estudo transversal, foram coletados dados epidemiológicos e laboratoriais e analisados os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) dos genes *LGALS3* (rs4644) e *IL-10* (rs1800871) por reação em cadeia da polimerase quantitativa, utilizando-se o *QuantStudio 5*, a partir de DNAs extraídos de sangue total de 295 pacientes (45 LV/HIV sintomático e 54 assintomático e 196 HIV). As quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10 foram quantificadas por citometria de fluxo *FACSCalibur* em 160 amostras de soro (53 LV/HIV assintomático, 90 HIV e 17 controles negativos), a partir do sistema *Cytometric Bead Array*. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo *GraphPad Prism 8*. Nossos resultados confirmaram a associação entre o polimorfismo *IL-10* (rs1800871) e a coinfeção LV/HIV ($p=0,038$, OR 1,840, IC 95% 0,996=3,312), sugerindo o envolvimento de mecanismos genéticos na suscetibilidade à LV em pacientes com HIV. Os cinco SNPs de *LGALS3* e os cinco de *IL-10* próximos a rs4644 e rs1800871, respectivamente, revelaram desequilíbrio de ligação ($r^2>0,8$), podendo estar associados à coinfeção LV/HIV. As quimiocinas CCL2, CCL5, MIG e IP-10 apresentaram diferenças significativas entre os grupos LV/HIV e HIV ($p<0,0001$), com níveis mais elevados entre os monoinfectados com HIV, demonstrando um ambiente pró-inflamatório mais significativo nesta condição. Por sua vez, as quimiocinas CXCL8 e CCL2; MIG e CCL2; IP-10 e CCL2; MIG e CCL5; IP-10 e MIG foram positivamente correlacionadas entre si no grupo LV/HIV, sugerindo uma ação sinérgica entre elas, por participarem de mecanismos inflamatórios semelhantes associados ao controle da infecção. A associação negativa entre a CXCL8 e a carga viral na coinfeção LV/HIV indica possíveis interações entre a *Leishmania* spp e o HIV. Desse modo, sugerimos o SNP rs1800871 como biomarcador da coinfeção LV/HIV e novos estudos que investiguem o papel das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10 na LV/HIV.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; infecções por HIV; quimiocinas; polimorfismo genético.

ABSTRACT

MONTEIRO, Bruna Eduarda Freitas. Evaluation of immunogenetic biomarkers involved in visceral leishmaniasis in HIV patients. 2023. Dissertation (Academic Master's Degree in Biosciences and Biotechnology in Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2023.

Visceral leishmaniasis (VL), when associated with human immunodeficiency virus (HIV), becomes a more serious disease, with an increase in the lethality of affected individuals, and may be influenced by immunogenetic aspects of the host. Therefore, the aim of this study was to evaluate immunogenetic biomarkers involved in susceptibility to visceral leishmaniasis in HIV patients (VL/HIV) from the State of Pernambuco. In this cross-sectional study, epidemiological and laboratory data were collected and single nucleotide polymorphisms (SNP) of *LGALS3* (rs4644) and *IL-10* (rs1800871) genes were analyzed by quantitative polymerase chain reaction, using QuantStudio 5, from DNAs extracted from whole blood of 295 patients (45 VL/HIV symptomatic and 54 asymptomatic; 196 HIV). Chemokines CCL2, CCL5, CXCL8, MIG and IP-10 were quantified by FACSCalibur™ flow cytometry in 160 serum samples (53 asymptomatic VL/HIV, 90 HIV and 17 healthy controls) from the Cytometric Bead Array system. The data obtained were statistically analyzed by GraphPad Prism 8. Our results confirmed the association between the *IL-10* polymorphism (rs1800871) and VL/HIV coinfection ($p=0.038$, OR 1.840, 95% CI 0.996=3.312), suggesting the involvement of genetic mechanisms in VL susceptibility in HIV patients. The five SNPs of *LGALS3* and the five of *IL-10* near rs4644 and rs1800871 respectively revealed linkage disequilibrium ($r^2>0.8$) and may be associated with VL/HIV coinfection. Chemokines CCL2, CCL5, MIG and IP-10 showed significant differences between VL/HIV and HIV groups ($p<0.0001$) with higher levels among HIV monoinfected, displaying a more significant pro-inflammatory environment in this condition. Furthermore, chemokines CXCL8 and CCL2; MIG and CCL2; IP-10 and CCL2; MIG and CCL5; IP-10 and MIG were positively correlated with each other in the VL/HIV coinfecting group suggesting a synergistic action between them, as they participate in similar inflammatory mechanisms associated with infection control. The negative association between CXCL8 and viral load in VL/HIV coinfection indicates possible interactions between *Leishmania* spp. and HIV with important effects on the host's immune response. Thus, we suggest the rs1800871 SNP as a biomarker of VL/HIV coinfection, and new studies that investigate the role of chemokines CCL2, CCL5, CXCL8, MIG, and IP-10 in VL/HIV.

Keywords: visceral leishmaniasis; HIV infections; chemokines; polymorphism genetic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição dos casos de leishmaniose visceral por países em 2020.....	20
Figura 2 - Distribuição da leishmaniose visceral por Unidades Federativas no Brasil em 2018.....	21
Figura 3 - Formas evolutivas do gênero <i>Leishmania</i> : promastigotas (A) e amastigotas (B).....	24
Figura 4 - Ciclo biológico da leishmaniose visceral no homem.....	25
Figura 5 - Distribuição dos casos de leishmanioses e coinfeção leishmaniose/HIV por países em 2018.....	27
Figura 6 - Interação de diferentes componentes do sistema imunológico inato e adaptativo na coinfeção <i>Leishmania</i> /HIV.....	29
Quadro 1 - Descrição de cinco quimiocinas com seu respectivo ligante, receptor e processo biológico.....	31
Figura 7 - Mecanismos de sinalização imunológicos envolvidos na expressão do HIV-1 mediada por <i>Leishmania spp.</i>	32
Figura 8 - Manifestação clínica na coinfeção por <i>Leishmania spp.</i> e HIV em decorrência da resposta imunológica.....	35
Quadro 2 - Principais testes imunológicos utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral.....	39
Quadro 3 - Principais testes moleculares utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral.....	41
Figura 9 - Aplicabilidade de biomarcadores.....	44
Figura 10 - Ideograma do cromossomo 1 (A) e cromossomo 14 (B)	48
Quadro 4 - Polimorfismos genéticos de <i>LGALS3</i> e <i>IL-10</i>	55
Quadro 5 - Limite de detecção das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10.....	56
Figura 11 - Análise de desequilíbrio de ligação (LD) do rs4644 do gene <i>LGALS3</i>	61
Figura 12 - Análise de desequilíbrio de ligação (LD) do rs1080871 do gene <i>IL-10</i>	62
Figura 13 - Comparações entre os níveis séricos de quimiocinas entre os	

	grupos de comparações.....	63
Figura 14 -	Rede de interação das proteínas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características epidemiológicas de 53 assintomáticos coinfectados leishmaniose visceral/HIV, 90 monoinfectados pelo HIV e 17 controles negativos (CN).....	58
Tabela 2 - Características laboratoriais de 53 assintomáticos coinfectados leishmaniose visceral/HIV e 90 monoinfectados HIV.....	59
Tabela 3 - Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene <i>LGALS3</i> (rs4644), em pacientes coinfectados leishmaniose visceral/HIV e monoinfectados HIV.....	60
Tabela 4 - Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene <i>IL-10</i> (rs1800871) em pacientes coinfectados leishmaniose visceral/HIV e monoinfectados HIV.....	60
Tabela 5 - Níveis séricos das quimiocinas em pacientes assintomáticos coinfectados leishmaniose visceral/HIV, monoinfectados HIV e controles negativos (CN).....	63
Tabela 6 - Correlações entre as quimiocinas séricas e parâmetros hematológicos e bioquímicos no grupo assintomático coinfectado leishmaniose visceral/HIV.....	64
Tabela 7 - Correlações entre as quimiocinas séricas e parâmetros hematológicos e bioquímicos no grupo monoinfectado HIV.....	64
Tabela 8 - Correlações entre as quimiocinas séricas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10 no grupo assintomático coinfectado leishmaniose visceral/HIV.....	65
Tabela 9 - Correlações entre as quimiocinas séricas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10 no grupo monoinfectado HIV.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cAMP	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
APCs	Células apresentadoras de antígenos
Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CCL	Cysteine-cysteine chemokine ligands
CCR	Cysteine-cysteine chemokine receptor
CD	Cluster de diferenciação
COX-2	Ciclooxigenase-2
CPA	Teste de proliferação celular
CR	Receptor de complemento
CXCL	CXC motif chemokine ligand
CXCR	Receptores de quimiocinas CXC
DAT	Teste de aglutinação direta
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Gal-3	Galectina-3
gp63	Glicoproteína 63
HAART	Terapia anti-retroviral altamente ativa
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC	Intervalo de confiança
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Sintetase induzível de óxido nítrico
IP-10	Proteína 10 induzível pelo INF- γ
ITS	Regiões espaçadoras de transcrito interno
KAtex	Teste de aglutinação em látex
kDNA	DNA do cinetoplasto
KEGG	Enciclopédia de Kyoto de genes e genomas
LAMP	Amplificação isotérmica mediada por Loop
LDT	Laboratório de Doenças Transmissíveis
LGALS3	Gene da Galectina-3

LPG	Lipofosfoglicano
LTR	Repetição terminal longa
LST	Teste cutâneo da <i>Leishmania</i>
LV	Leishmaniose Visceral
LV/HIV	Coinfecção Leishmaniose visceral e HIV
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIG	Monocina induzida pelo IFN- γ
MSP	Principal protease de superfície
NF-kB	Fator nuclear kappa-B
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds ratio
<i>P</i>	<i>p</i> valor, probabilidade de significância
PCLV	Programa de Controle da Leishmaniose Visceral
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGE2	Prostaglandina E2
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PPI	Interação Proteína-Proteína
PTK	Tirosina quinase
qPCR	PCR em tempo real
RANTES	Regulado após a ativação, células T normais expressas e secretadas
rK39-ICT	Teste imunocromatográfico baseado em antígeno recombinante
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	Ácido ribonucleico
rK39	Proteína recombinante cinesina 39
RAPD	Amplificação aleatória do DNA polimórfico
RNA _m	RNA mensageiro
18s-rRNA	RNA ribossômico 18S
sCD14	Soluble CD14
sCD40L	Soluble CD40 ligand
SDF-1 α	Stromal cell-derived factor 1

SLC11A1	Solute carrier family 11 member 1
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SSU rRNA	Gene da subunidade ribossômica
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
STRING	Redes de associação proteína-proteína
Tat	Proteína de transativação de HIV-1
TGFB	Fator de crescimento transformador beta
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
Th17	Linfócito T helper 17
TNF	Fator de necrose tumoral alfa
Tregs	Células T regulatórias
TR1	Teste rápido 1
TR2	Teste rápido 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	LEISHMANIOSE VISCERAL.....	20
2.1.1	Aspectos epidemiológicos	20
2.1.2	Classificação taxonômica	23
2.1.3	Aspectos biológicos	24
2.2	COINFECÇÃO LV/HIV.....	27
2.2.1	Imunopatogênese	28
2.2.2	Aspectos clínicos e tratamento	35
2.2.3	Diagnóstico laboratorial	37
2.2.4	Biomarcadores imunogenéticos	44
3	JUSTIFICATIVA	50
4	PERGUNTA CONDUTORA	51
5	HIPÓTESE	52
6	OBJETIVOS	53
6.1	OBJETIVO GERAL.....	53
6.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	53
7	METODOLOGIA	54
7.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	54
7.2	DESENHO E ÁREA DE ESTUDO.....	54
7.3	GRUPOS DE ESTUDO E TESTE DE TRIAGEM.....	54
7.4	TAMANHO AMOSTRAL.....	55
7.5	CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E LABORATORIAL.....	55
7.6	ENSAIOS DE GENOTIPAGEM.....	55
7.7	QUANTIFICAÇÃO DAS QUIMIOCINAS.....	56
7.8	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA.....	56
7.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
8	RESULTADOS	58
8.1	CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E LABORATORIAIS.....	58
8.2	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS.....	59
8.3	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	60

8.4	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE QUIMIOCINAS.....	62
8.5	CORRELAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS DE QUIMIOCINAS E DADOS LABORATORIAIS.....	63
8.6	ANÁLISE DAS INTERAÇÕES PROTEICAS DE CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10.....	65
9	DISCUSSÃO.....	67
10	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	87
	ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	88

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença de acometimento sistêmico e crônico, causado por protozoários intracelulares pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, que inclui duas espécies do subgênero *Leishmania*: *L. (Leishmania) donovani* e *L. (L.) infantum* (LUKES *et al.*, 2007). Em áreas endêmicas para a LV, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) eleva ainda mais o risco de desenvolvimento da doença, ao passo que, a LV acelera a progressão para Aids (ALVAR *et al.*, 2008). Em condição de coinfeção leishmaniose visceral entre pessoas que convive com HIV (LV/HIV), é verificado um atraso no diagnóstico e baixa resposta à terapia farmacológica empregada, possibilitando evoluções desfavoráveis, incluindo recidivas e maior risco de morte. Assim, há necessidade de novas estratégias que possam auxiliar o diagnóstico e o manejo adequado desses indivíduos (BOTANA *et al.*, 2019).

Diferentes fatores estão associados com a suscetibilidade à coinfeção LV/HIV, incluindo fatores imunológicos e genéticos. Do ponto de vista imunológico, a infecção assintomática de *Leishmania* spp. em indivíduos com HIV é caracterizada pela predominância da resposta celular Th1 (T helper 1) (EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010; MAKSOUD *et al.*, 2022). Essa resposta celular envolve a atuação de moléculas pró-inflamatórias e dentre elas sugere-se que as quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10 e a galectina 3 (Gal-3) participem do desenvolvimento da resposta imune contra as espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* ao induzirem a ativação de macrófagos e no desencadeamento da imunidade adaptativa associada à resposta celular do tipo Th1 (IBARRA-MENESES; MORENO; CARRILLO, 2019; DATTA *et al.*, 2019).

Uma vez que o parasita é capaz de evadir desse tipo de resposta, a doença se desenvolve. Deste modo, é sugerido que a *Leishmania* spp. e o HIV atuam de forma sinérgica promovendo uma resposta celular do tipo Th2, em que há o predomínio de moléculas anti-inflamatórias. Esse perfil imunológico se encontra associado à suscetibilidade do hospedeiro e a progressão da infecção. A interleucina 10 (IL-10) possui papel fundamental nesse processo, ao inibir funções efetoras de células imunológicas, como os macrófagos e células dendríticas favorecendo a disseminação dos parasitas (ABDULLAHI *et al.*, 2020). Assim, o equilíbrio ou

mudanças na expressão de tais moléculas podem controlar ou favorecer a progressão de LV/HIV (BOTANA *et al.*, 2019; BARBOSA-JÚNIOR *et al.*, 2020a,b).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) presente nos genes dessas moléculas podem influenciar na expressão e/ou atividade da proteína no desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro à infecção. O SNP (rs4644) presente no gene da galectina 3 (*LGALS3*) promove mudança na conformação da proteína e conseqüentemente disponibilidade da molécula. Esse polimorfismo foi associado a níveis reduzidos de Gal-3 e a suscetibilidade ao desenvolvimento de infecção em trato respiratório de crianças com anemia falciforme (BELMONT *et al.*, 2016), progressão de câncer gástrico (FURUYA *et al.*, 2018) e artrite reumatóide (XU *et al.*, 2021), mas não foi estudado em pacientes com LV. Um único estudo investigou e revelou a associação do SNP presente na região promotora do gene *IL-10* (rs1800871) com a suscetibilidade à LV, em uma população iraniana (n=190) infectada por *L. infantum*, indicando ser um fator de risco para a doença (HAJILOOI *et al.*, 2013).

Assim, investigações envolvendo fatores imunogenéticos na coinfeção LV/HIV contribuem para o entendimento de processos de patogenicidade, uma vez que permanecem pouco compreendidos. Ao revelar associação com a doença poderão ser selecionados como potenciais biomarcadores no intuito de auxiliar no manejo adequado desses pacientes (BARBOSA-JÚNIOR *et al.*, 2020a,b). Neste estudo é proposto a avaliação de moléculas imunológicas (CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10) e fatores genéticos (*LGALS3* rs4644; *IL-10* rs1800871) em indivíduos coinfectados LV/HIV para melhor compreender os mecanismos imunogenéticos envolvidos na coinfeção LV/HIV. Além disso, destacamos o ineditismo desse trabalho, visto que não há estudos envolvendo os SNPs *LGALS3* rs4644; *IL-10* rs1800871 e as quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10 na população LV/HIV brasileira.

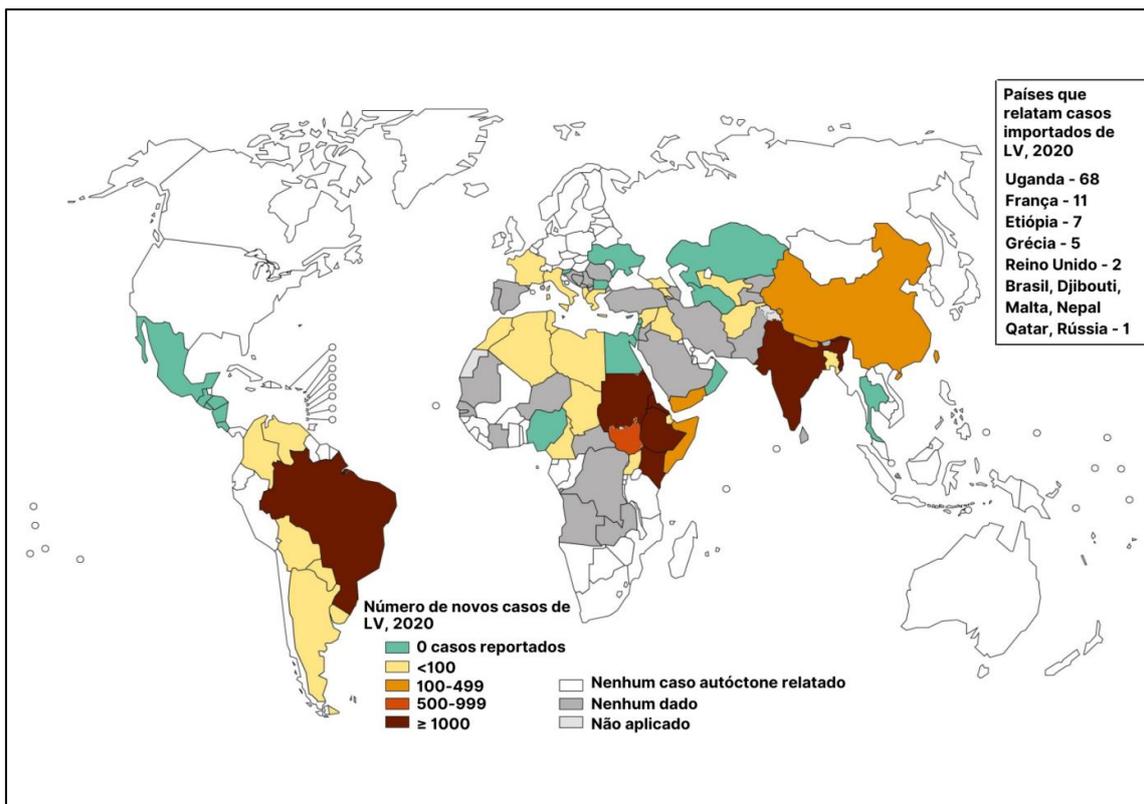
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. LEISHMANIOSE VISCERAL

2.1.1 Aspectos epidemiológicos

A leishmaniose visceral (LV), é uma doença parasitária de grande importância, devido ao seu potencial de surto e alta letalidade (ORYAN; AKBARI, 2016). Estima-se uma incidência anual de 50.000 a 90.000 novos casos para a LV, com 89% dos casos globais relatados em oito países: Brasil, Índia, Somália, Eritreia, Quênia, Sudão e Sudão do Sul (Figura 1) (WHO, 2021). É associada às desfavoráveis condições socioeconômicas e ao baixo acesso aos serviços de saúde, atrelada a fatores de risco que incluem a espécie e carga parasitária, a desnutrição, mobilidade populacional e imunocomprometimento (MANN *et al.*, 2021).

Figura 1 - Distribuição dos casos de leishmaniose visceral por países em 2020.



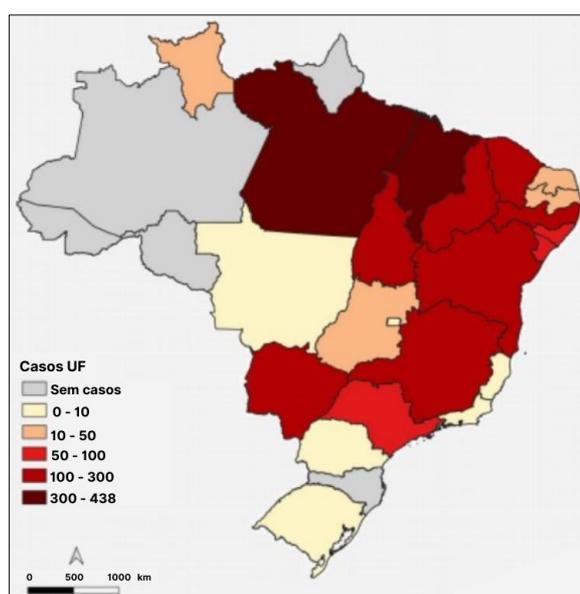
Fonte: WHO (2021), com modificações.

Nas áreas endêmicas, a LV tinha uma transmissão de caráter rural, afetando hospedeiros vertebrados como raposas e marsupiais. No entanto, a partir da década de 90, através de estudos de casos humanos e caninos, verificou-se uma transição epidemiológica da doença para os centros urbanos (SOUSA; RAMALHO; MELO,

2018). Essa expansão se deu principalmente a partir de modificações no padrão de transmissão da doença, decorrentes de mudanças ambientais ocorridas no processo de urbanização. Esse processo foi relatado em países como a Itália (FERROGLIO *et al.*, 2018), Irã (HANAFI-BOJD *et al.*, 2015), México (GONZALEZ *et al.*, 2011), Marrocos (KBAICH *et al.*, 2017), Brasil (SOUSA; RAMALHO; MELO, 2018) e Colômbia (CASTILLO-CASTAÑEDA *et al.*, 2021), aumentando-se desta forma, a preocupação de surtos em países e áreas anteriormente indenes. Assim, nos últimos 30 anos, através das mudanças verificadas no perfil epidemiológico da doença, atrelado ao aumento de casos, a LV tornou-se uma das parasitoses com prioridade pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2007).

No Brasil, esse processo contribuiu para a ocorrência de casos autóctones em todas as regiões, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública do país (SOUSA; RAMALHO; MELO, 2018). Em 2022, mais de 1.400 casos foram reportados no país e dentre as 27 unidades federativas no Brasil, há registro de casos em 21, havendo maior concentração na região Nordeste (Figura 2) (BRASIL, 2019; WHO, 2022). Pernambuco, por sua vez, respondeu por 2,8% dos casos no Brasil entre o período de 2007 a 2017 (BUARQUE *et al.*, 2021), sendo o Vale do São Francisco a macrorregião pernambucana mais endêmica, sobretudo o município de Petrolina (COUTINHO *et al.*, 2017; DINIZ; SOUSA; CARMO, 2018).

Figura 2 - Distribuição da leishmaniose visceral por Unidades Federativas no Brasil em 2018.



Fonte: Brasil (2019).

Coutinho *et al.* (2017), avaliaram o perfil epidemiológico de casos notificados para LV em Petrolina e entre os anos 2007-2017 houve predominância de casos de crianças do sexo masculino e residente na zona urbana do município. A maior suscetibilidade à doença verificada em indivíduos do sexo masculino pode estar relacionada à diferenças sociais (maior exposição à ambientes com transmissão natural da infecção) e biológicas (fatores genéticos e hormonais) (SNIDER *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ *et al.*, 2018; CLOOTS *et al.*, 2020). A faixa etária infantil mais acometida pode ser devido ao sistema imunológico em formação (COUTINHO *et al.*, 2017). Ademais, também foi observada uma maior frequência da doença em área urbana, o que provavelmente seria devido aos problemas sanitários, ao aglomerado urbano verificados na cidade e uma maior exposição ao vetor em áreas peridomiciliares (COUTINHO *et al.*, 2017).

O Ministério da Saúde por meio do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), estabelece ações no intuito de reduzir a transmissão e morbimortalidade por LV (BRASIL, 2014). As estratégias encontram-se fundamentadas na ecologia e epidemiologia da doença, incluindo medidas referentes ao vetor, por possuir uma elevada capacidade de adaptação a variados ambientes, contribuindo para a reativação do ciclo de transmissão de forma constante e o reservatório canino, em regiões urbanas, trazendo implicações (WERNECK, 2016). Além disso, entende-se que é de extrema importância a educação em saúde, um diagnóstico precoce e a disponibilidade de medicamentos para o tratamento de maneira imediata; tornando-se, portanto, um desafio para os serviços de saúde (WERNECK, 2016; BRASIL, 2018).

Contudo, muito se discute se estas medidas estão sendo efetivas no controle, uma vez que a doença permanece como um grande problema de saúde pública (LUZ, 2016). Zuben e Donalísio (2016), acreditam que essas medidas não são eficientes na redução da incidência da LV no Brasil, devido às dificuldades em sua execução. Esses autores exploram sobre os problemas estruturais serem o cerne da questão, tais como: a falta de insumos e de recursos humanos contribuindo para a baixa cobertura de tais estratégias, bem como a descontinuidade das ações de controle. Dentre as várias dificuldades destacam-se (i) a resistência cada vez maior dos donos de cães em permitir o acesso das equipes do PCLV; (ii) a baixa prioridade da LV quando comparado a outras doenças, como a dengue; (iii) a dificuldade de diagnóstico e prognóstico por meio dos testes usualmente

empregados; (iv) a baixa efetividade de ações voltadas à educação em saúde, pautado na lógica em que as pessoas não são passivas e sim protagonistas do processo; além de (v) problemas com o saneamento ambiental (ZUBEN; DONALÍSIO, 2016).

Em Pernambuco, através do Programa de enfrentamento às doenças negligenciadas (SANAR), a Secretaria Estadual de Saúde, tem investido esforços no combate às doenças negligenciadas relacionadas à pobreza, incluindo a LV (PERNAMBUCO, 2020). A cada quadriênio, diferentes municípios são contemplados e as estratégias implementadas são aprimoradas. Tais ações se baseiam no fortalecimento da vigilância, bem como da atenção à saúde, visando a identificação contínua de casos e o manejo clínico adequado dos indivíduos (PERNAMBUCO, 2020).

2.1.2 Classificação taxonômica

A leishmaniose visceral é causada por protozoários unicelulares pertencentes ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), e ao subgênero *Leishmania* (SAF'JANOVA, 1982), ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (NEVES, 2016).

Como característica desta ordem e subgênero, possuem uma região especializada e única conhecida por cinetoplasto e a forma evolutiva promastigota desenvolve-se exclusivamente na porção média e anterior do intestino do inseto vetor, respectivamente (NEVES, 2016). Esses protozoários pertencem ao complexo *Leishmania donovani*, o qual reúne duas espécies, *L. (L.) donovani* encontrada na Ásia e África e *L. (L.) infantum* em países do Mediterrâneo e da Ásia (LUKES *et al.*, 2007).

Nas Américas, a identidade do agente etiológico da LV tem sido objeto de inúmeras discussões, uma vez que ao longo do tempo algumas hipóteses indicavam a *L. (L.) chagasi* (CUNHA; CHAGAS, 1937) como uma espécie autóctone nova, causadora da LV nesta região (LAINSON; SHAW, 2005). Mauricio *et al.* (1999) reconhecem que a *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* são filogeneticamente semelhantes, uma vez que análises envolvendo o sequenciamento parcial de um único gene constitutivo da principal protease de superfície (MSP) e amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD) mostraram semelhanças nos perfis genéticos entre ambas as espécies. Desse modo, para os autores, a *L. (L.) chagasi* seria sinonímia de *L. (L.) infantum*, favorecendo a hipótese de que a espécie *L. (L.)*

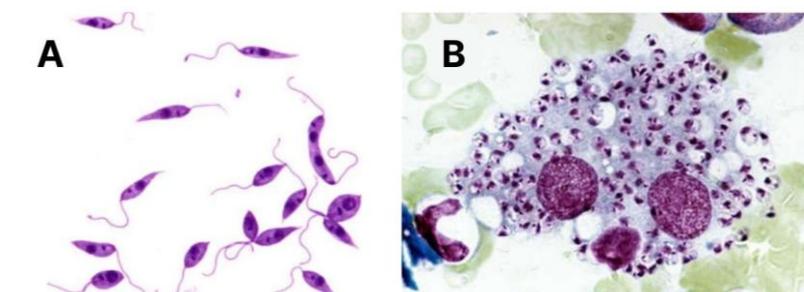
infantum teria sido introduzido na América do Sul durante os períodos de colonização ibérica, adaptando-se a novos hospedeiros e vetores (MARTINEZ *et al.*, 2003; LUKES, 2007; FERNÁNDEZ-COTRINA *et al.*, 2013).

Contudo, pequenas diferenças genéticas identificadas entre *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum*, levaram Lainson, Miles e Shaw (1981) a sugerirem uma separação taxonômica a nível subespecífico, sendo *L. (L.) infantum* para o agente etiológico da LV no Velho Mundo e *L. (L.) infantum chagasi* para o Novo Mundo. Contudo, atualmente a nomenclatura mais utilizada quanto a espécie responsável pela LV no Continente Americano é a *L. (L.) infantum* (sin. *L. (L.) chagasi*), até que uma nova classificação para o gênero seja consenso científico (LUKES *et al.*, 2007).

2.1.3 Aspectos biológicos

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem duas principais formas evolutivas distintas em seu ciclo de vida, a promastigota presente no vetor e amastigota no hospedeiro vertebrado. Essa primeira forma parasitária é encontrada em tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, cujo comprimento pode ser observado variando de 10-40 x 1,5-3µm, com a presença de um flagelo anterior livre e longo permitindo a sua motilidade (NEVES, 2016). Na região mediana é observado um núcleo oval ou arredondado e um cinetoplasto em formato de bastão, localizando-se entre a extremidade anterior e o núcleo do parasito (Figura 3A). Em contrapartida, a forma amastigota se caracteriza por ser oval, esférico ou fusiforme, medindo cerca de 1,5 a 3 x 3 a 6,5µm. O seu núcleo é grande e arredondado, preenchendo grande parte do citoplasma e se encontra lateralmente ao pequeno cinetoplasto em forma de bastonete. Não possui flagelo livre e por isso, são imóveis, sendo encontrados interiorizados em células do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros vertebrados, como demonstrado na Figura 3B (MOREIRA, 2017).

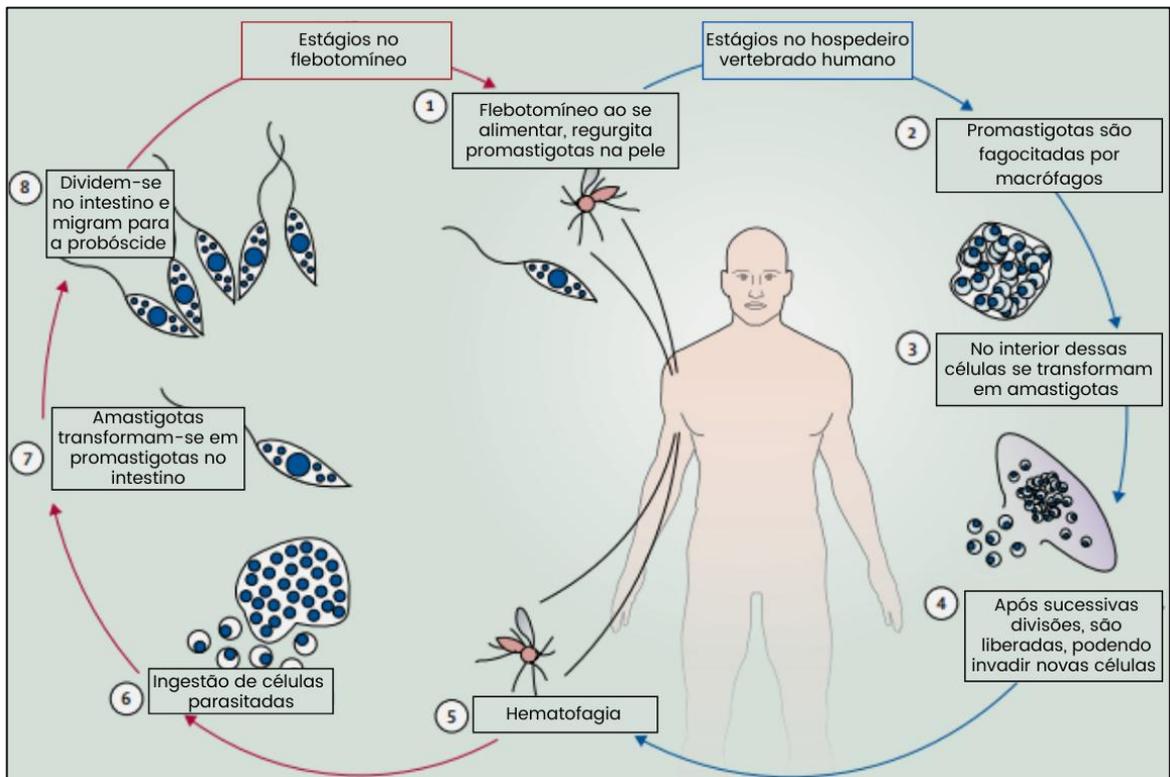
Figura 3 - Formas evolutivas do gênero *Leishmania*: promastigotas (A) e amastigotas (B)



Fonte: Moreira (2017).

A principal forma de transmissão da LV ao hospedeiro vertebrado (roedores, canídeos, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos, primatas e o homem), se dá através da picada de fêmea infectada (Figura 4) da ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (NEVES, 2016). Nesse processo, o inseto inocula saliva, contendo componentes biológicos com ação anticoagulante, vasodilatadora e antiagregador plaquetário, permitindo o seu período de repasto sanguíneo (REGO *et al.*, 2021).

Figura 4 - Ciclo biológico da leishmaniose visceral no homem.



Fonte: Burza *et al.* (2018), com modificações.

Uma vez injetados pela probóscide, as formas promastigotas metacíclicas (infectivas) interagem com as células de origem mieloide, incluindo macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas (DCs), através de processos que envolvem o reconhecimento e adesão (BONFIM; SCOTT; CALDERON, 2022). Esse mecanismo é mediado pela interação de moléculas expostas na superfície do protozoário (lipofosfoglicano - LPG, glicoproteína gp63) à diferentes receptores de células do hospedeiro, tais como: receptores de complemento tipo 1, 3 (CR1, CR3), receptores de manose e de fibronectina; seguida da sinalização e invasão (KUMAR, 2021).

Embora o parasitismo possa ocorrer em diferentes células, a internalização e a sobrevivência se dão preferencialmente em macrófagos (MERIDA-DE-BARROS *et al.*, 2018). Em seu interior, a promastigota metacíclica é encontrada dentro do vacúolo fagocitário, o qual se transforma em amastigota. Deste modo, multiplica intensamente subvertendo as defesas celulares do hospedeiro (KUMAR, 2021). Após sucessivos processos de divisão binária, há o rompimento da membrana celular e a consequente liberação das formas amastigotas, que poderão invadir outras células em novos sítios, através do sistema vascular e linfático, atingindo órgãos como fígado, baço e medula óssea, ou serem ingeridas por novos flebótomos (BURZA *et al.*, 2018).

No intestino médio do inseto, as amastigotas são protegidas da ação de enzimas digestivas por uma estrutura denominada, matriz peritrófica (OMONDI *et al.*, 2022). Em seguida, há o rompimento dos macrófagos ingeridos e a liberação dos parasitos, se diferenciando em promastigotas. Após sucessivas divisões, estes seguem pela porção torácica do intestino até sua completa diferenciação em promastigotas metacíclicas infectantes, o qual estarão prontos para infectar um novo hospedeiro vertebrado como visualizamos na figura 4 (NEVES, 2016).

Esses vetores da LV são encontrados principalmente em regiões tropicais e subtropicais, os quais dois gêneros se destacam por serem os principais vetores, *Phlebotomus* e *Lutzomyia* no Velho e no Novo Mundo, respectivamente (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). No Brasil, duas espécies principais são responsáveis pela transmissão, *L. longipalpis* e *L. cruzi* (PERNAMBUCO, 2020). Ademais, há possibilidades de transmissão não vetorial incluindo infecção acidental laboratorial, transfusão sanguínea, instrumentos perfuro-cortantes, vias sexuais ou transplante de órgãos, porém permanecem pouco documentadas (AVILA-GARCÍA *et al.*, 2014; BURZA *et al.*, 2018; GUEDES *et al.*, 2020).

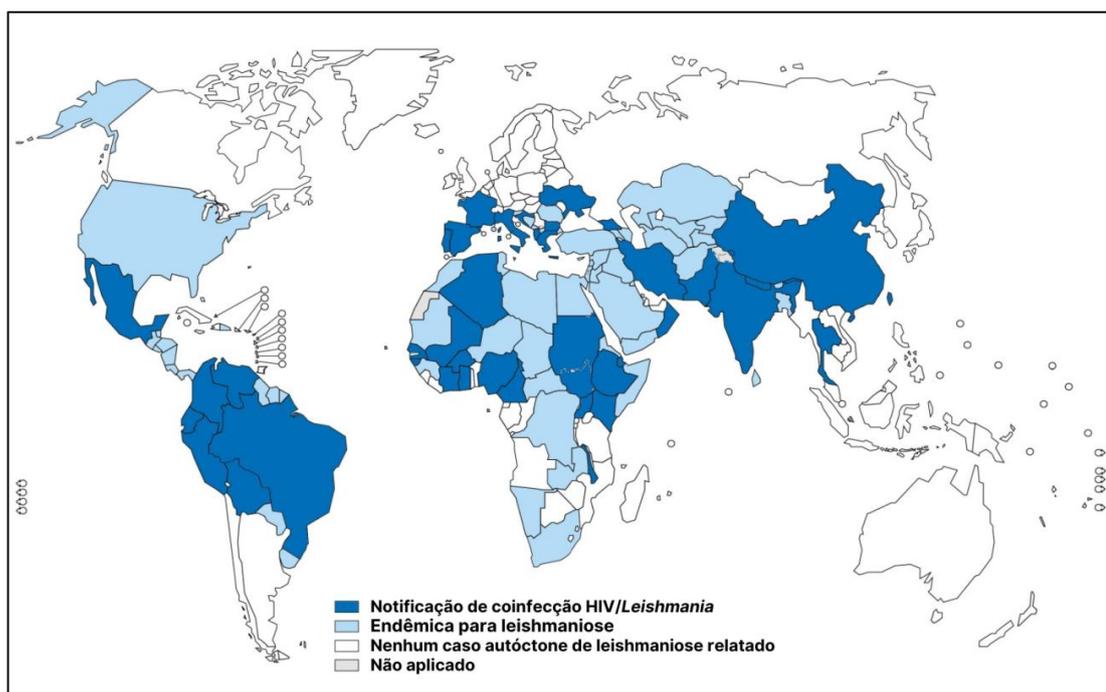
Assim, a ocorrência da doença em uma área depende primariamente da presença do vetor e de hospedeiros/reservatórios suscetíveis. Em ambiente doméstico, o cão é reconhecido como um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores sendo, portanto, um dos principais alvos nas estratégias de controle (BRASIL, 2015).

2.2 COINFECÇÃO LV/HIV

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (2015), a definição de caso da coinfeção LV/HIV se dá pela presença de LV e infecção concomitante pelo HIV, independentemente da definição de Aids. Nesta condição, são observadas elevadas taxas de falha terapêutica e recidivas, e conseqüentemente maior letalidade, quando comparado os indivíduos sem HIV (CASADO *et al.*, 2015).

Estima-se que aproximadamente um terço da população mundial infectada com HIV reside em áreas de risco de transmissão da LV. A figura 5 mostra a distribuição de casos notificados de *Leishmania*/HIV, o qual favorece o crescente número de casos dessa coinfeção, com relatos em 45 países (WHO, 2018).

Figura 5 - Distribuição dos casos de leishmanioses e coinfeção leishmaniose/HIV por países em 2018.



Fonte: WHO (2018), com modificações.

O Brasil se destaca dentre os países da América Latina, dada a alta prevalência verificada de coinfeção (9%) (SOUSA-GOMES; ROMERO; WERNECK, 2017). Apesar de apresentar uma política de livre acesso à terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART), muitos indivíduos infectados pelo HIV não seguem um regime de tratamento tornando-se desse modo mais suscetíveis a outras doenças, como a LV (CIPRIANO *et al.*, 2017).

Em Pernambuco, nosso grupo realizou a primeira investigação de coinfeção, identificando 10 casos de LV/HIV entre 14 indivíduos com suspeita de LV através de um conjunto de ferramentas de diagnóstico (detecção parasitológica, imunológica e molecular) (CAVALCANTI *et al.*, 2012). Além desse, novos relatos ocorreram posteriormente por nossa equipe, incluindo o trabalho realizado por Silva *et al.* (2013), que descreveram um indivíduo com HIV com múltiplos episódios de LV. Guedes *et al.* (2018) identificaram uma alta prevalência de infecção por *L.(L.) infantum* (16,9%) em pacientes internos com HIV em hospitais do Recife (35/207). Em Petrolina, foi relatada uma prevalência de 16,8% de LV/HIV entre casos notificados no período 2010-2016 (DINIZ; SOUZA; CARMO, 2018). Os estudos de Guedes *et al.* (2018) e de Diniz, Souza e Carmo (2018), referem-se ao quantitativo de pacientes internados com LV/HIV sintomática. Em outro estudo desenvolvido em Petrolina, foi verificado uma prevalência de 9,11% de LV/HIV assintomática a nível ambulatorial (44/483) (GUEDES *et al.*, 2021).

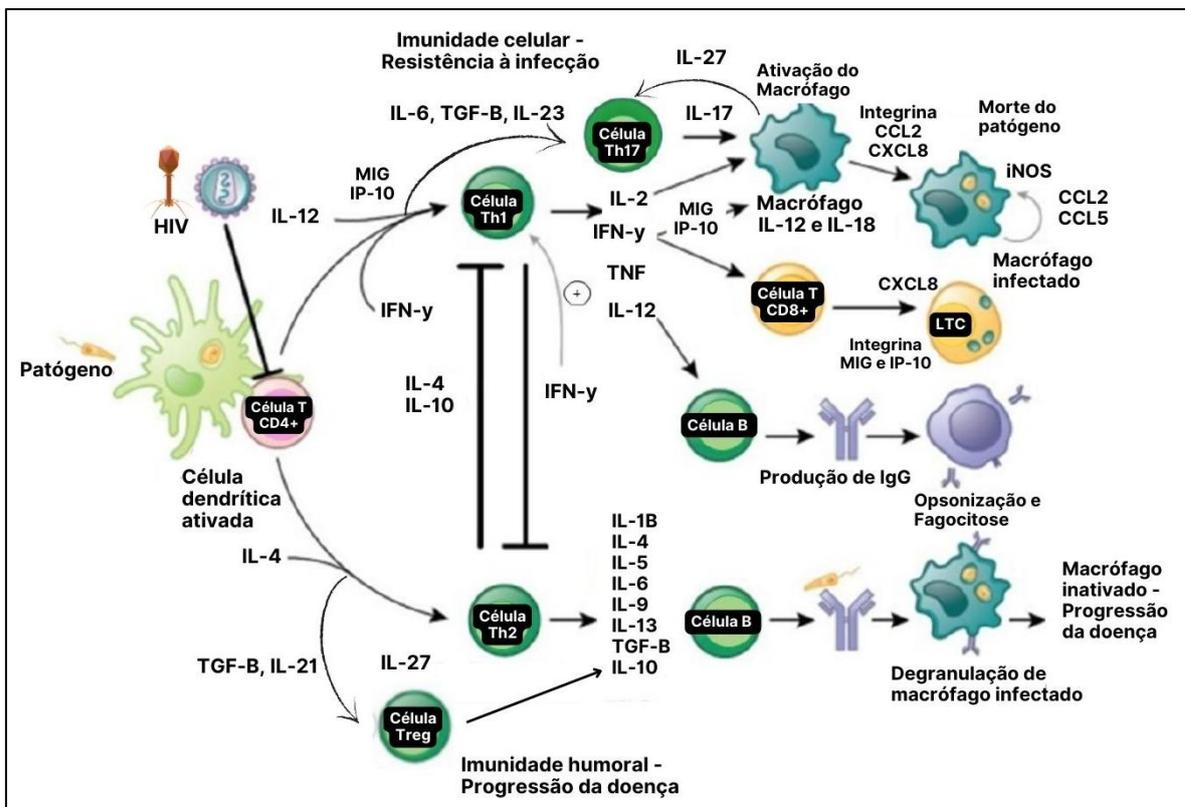
Estes dados realçam a importância de se investigar portadores assintomáticos, principalmente naqueles infectados pelo HIV, no intuito de orientar políticas públicas de saúde para o controle e eliminação da doença (VAN GRIENSVEN *et al.*, 2019; GUEDES *et al.*, 2021). Para isso, novas estratégias são necessárias, incluindo o aperfeiçoamento da vigilância da coinfeção LV/HIV, uma vez que a progressão do HIV facilita a suscetibilidade a LV, com evoluções desfavoráveis, incluindo o óbito (FERREIRA *et al.*, 2022). Essas estratégias resultarão em melhorias na profilaxia, no diagnóstico e tratamento, e, conseqüentemente na promoção da expectativa de vida e qualidade de vida desses pacientes (REZAEI *et al.*, 2018).

2.2.1 Imunopatogênese

Ao longo dos anos, vários esforços foram feitos para entender o mecanismo da imunopatogênese da coinfeção *Leishmania*/HIV (WOLDAY *et al.*, 1999; ROSSI *et al.*, 2018; MAKSOUD *et al.*, 2022). Apesar de muitos processos não se apresentarem totalmente elucidados, sabe-se que a infecção por *Leishmania* spp. e pelo HIV pode ocorrer em uma mesma célula hospedeira, como monócitos, macrófagos e células dendríticas. Nestas células, há interação entre ambos os agentes patogênicos, com efeitos importantes na resposta imune, incluindo a supressão imunológica (MAKSOUD *et al.*, 2022).

Segundo Maksoud *et al.* (2022), a infecção pelo HIV e *Leishmania* spp. reduz progressivamente a resposta imune Th1, favorecendo uma resposta celular do tipo Th2. O perfil Th1 está relacionado com as respostas imunes celulares associadas à resistência ao desenvolvimento da doença, sendo regulada por múltiplas citocinas pró-inflamatórias, incluindo as interleucinas (IL) - 2, 12, 15, 18, bem como interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF) (Figura 6) (EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010). O IFN- γ possui uma participação crucial nesse processo, ao atuar na indução de células efetoras, como o linfócito T citotóxico (CD8+) e macrófagos. Ao ser ativado, os macrófagos produzem IL-12 que age na diferenciação de linfócitos T na subpopulação Th1, na ativação de células NK (natural *killer*); na produção de TNF que promove processos inflamatórios e sintetase induzível de óxido nítrico (iNOS) relacionada a atividade microbicida deste tipo celular (Figura 6).

Figura 6 - Interação de diferentes componentes do sistema imunológico inato e adaptativo na coinfeção *Leishmania*/HIV.



Fonte: Ezra, Ochoa e Craft (2010), com modificações.

Nota: A célula dendrítica (DCs) ativada atua apresentando antígeno à célula T CD4+ virgem. Esse processo desencadeia a diferenciação dessas células em linfócito Th1 com papel na resistência à infecção. Esse perfil celular, atua na ativação de células imunes efetoras como os macrófagos e os linfócitos T citotóxicos (LTC), através da indução de um ambiente pró-inflamatório, constituído por citocinas e quimiocinas como IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-23, IL-12, MIG, IP-10, CCL2, CCL5 e CXCL8. De forma complementar ao Th1, as células Th17 agem promovendo a morte dos patógenos. Em

paralelo, o desenvolvimento da suscetibilidade do hospedeiro à infecção pelo HIV e *Leishmania* spp., está relacionado a incapacidade do antígeno em ativar DCs para produzir IL-12, resultando em uma via padrão de diferenciação de células T virgens em células Th2, secretoras de IL-1B, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e TGF-B. Tais citocinas agem no controle da resposta inflamatória, e, deste modo, favorecem, a progressão das doenças LV/Aids.

Ademais, moléculas quimiotáticas pró-inflamatórias atuam nesse processo, por serem responsáveis por exacerbar o recrutamento de células e a inflamação resultante. As quimiocinas induzidas por IFN- γ , MIG e IP-10, promovem a polarização Th1 via proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição *STAT1*, *STAT4* e *STAT5* (ZOHAR *et al.*, 2014). Na LV, apresentam importante papel na resistência a parasitemia e estiveram associadas a infecção assintomática (IBARRA-MENESES *et al.*, 2017a,b).

Quimiocinas como CCL2 e CCL5 podem contribuir para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora, ao estimular a produção de óxido nítrico (NO), participar da quimiotaxia monocitária e homeostase de neutrófilos, entre outros (STRING, 2022). Além disso, Dey *et al.* (2007) estudaram o papel da CCL2 em camundongos infectados por *L. (L.) donovani* e verificaram que essa quimiocina esteve associada com a restauração da capacidade de apresentação de antígenos prejudicada de macrófagos infectados, bem como na redução da expressão de RNAm da IL-10 (anti-inflamatória) e aumento da expressão de IL-12, IFN- γ , TNF e iNOS. No estudo de COSTA SANTIAGO *et al.* (2004) o tratamento com anti-CCL5 foi associado com o desenvolvimento da resposta Th2, tornando camundongos infectados por *L. major* mais suscetíveis à infecção.

A quimiocina CXCL8, possui importantes atividades protetoras contra a infecção por patógenos, incluindo, a ativação, degranulação e liberação de proteases microbicidas (gelatinase B) por neutrófilos; ativação de células T CD8+; explosão respiratória e ativação de integrinas em macrófagos (LÓPEZ-COTARELO *et al.*, 2017). No Quadro 1 é possível verificar as principais funções de cinco quimiocinas envolvidas na LV.

Quadro 1 - Descrição de cinco quimiocinas com seu respectivo ligante, receptor e processo biológico.

Ligante	Receptor	Processos Biológicos
CCL2	CXCR2	Mo (ativação, estímulo à produção de NO), regulação positiva de IL-1 e IL-6, liberação de ácido araquidônico, indução da expressão de integrinas (CD11c e CD11b), NK (aumenta a atividade citolítica), liberação de esterase.
CCL5	CCR1/ CCR2/ CCR3/CCR5	Mo (estímulo à produção de NO), NK (aumenta a atividade citolítica), quimiotaxia monocitária, resposta de defesa ao protozoário, resposta inflamatória ao estímulo antigênico.
CXCL8	CXCR1/ CXCR2	MC (quimiocinese), Neu (ativação, degranulação, explosão respiratória, liberação de gelatinase B, formação NET, quimiorrepulsão, ativação de integrinas), Mo (explosão respiratória, ativação de integrinas), TC (ativação), pré-BC (ativação de integrina).
MIG	CXCR3	Mo (estímulo à produção de NO), promove a polarização em Th1/Th17, ativação de integrinas.
IP-10	CXCR3	Mo (estímulo à produção de NO), promove a polarização em Th1/Th17, ativação de integrinas, DC (haptorrepulsão).

Fonte: López-Cotarelo *et al.* (2017), com modificações e STRING (<https://string-db.org/cgi/>).

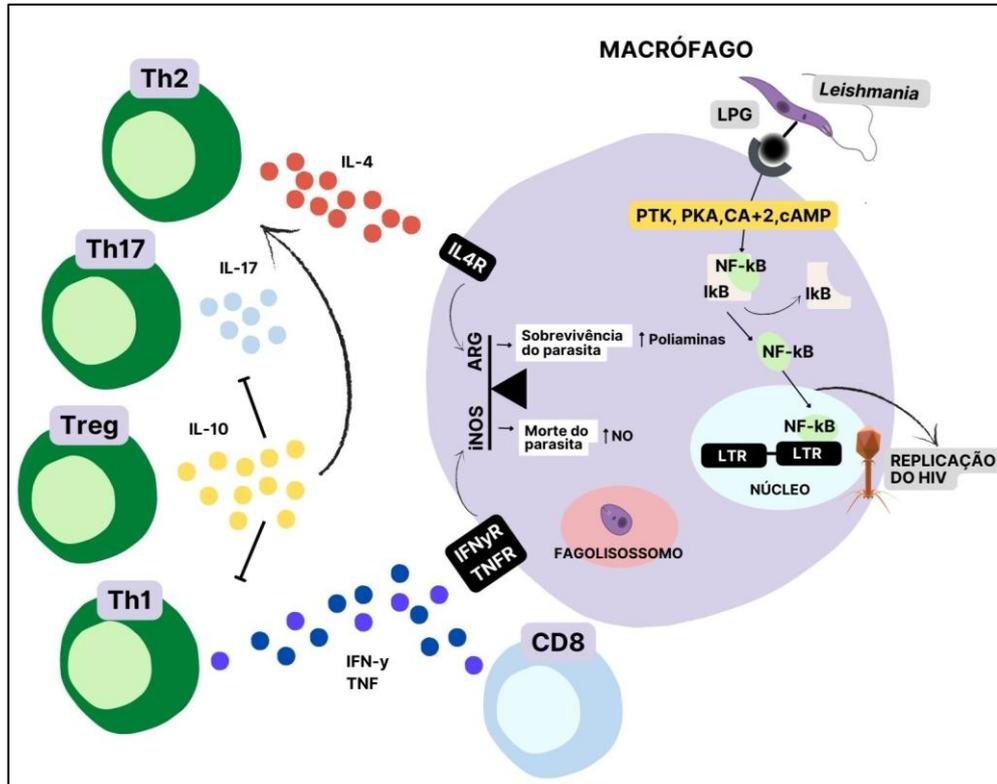
Legenda: MC- mastócitos; Neu- Neutrófilos; NET- armadilhas extracelulares dos neutrófilos; Mo- Macrófagos; TC- Linfócitos T; BC- Linfócitos B; NO (óxido nítrico); NK (natural killer), DC- célula dendrítica.

De maneira complementar, o subtipo celular Th17, relacionado com a produção de IL-17, possui papel na proteção da LV ao potencializar a resposta Th1 e atuar no recrutamento e ativação de leucócitos, como os neutrófilos e macrófagos (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017), sendo sua atuação significativa na resolução da infecção por *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* (PITTA *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Por outro lado, a condição clínica LV/HIV encontra-se associada à predominância da subpopulação Th2 e de células T regulatórias (Tregs) (ROSSI *et al.*, 2018). Essas células produzem as interleucinas 10 (IL-10), 4 (IL-4) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (ROSSI *et al.*, 2018; KUPANI *et al.*, 2020), que atuam na resposta deficiente do óxido nítrico em macrófagos, ao induzirem a expressão da enzima arginase que compete pela L-arginina (aminoácido essencial na produção do óxido nítrico) (SCHAFER *et al.*, 2006; TAKELE *et al.*, 2013). As poliaminas resultantes do catabolismo da L-arginina pela arginase, é um nutriente essencial para o desenvolvimento intracelular do protozoário (Figura 7) (GAUR *et al.*, 2007), ao passo que demonstra beneficiar a replicação do vírus, uma vez que o bloqueio de S-adenosilmetionina descarboxilase (enzima chave na síntese dessas moléculas), suprime a replicação do HIV-1 (SCHAFER *et al.*, 2006; TAKELE *et al.*,

2013).

Figura 7 - Mecanismos de sinalização imunológicos envolvidos na expressão do HIV-1 mediada por *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Olivier *et al.* (2003) e Rossi *et al.* (2018).

Nota: O desenvolvimento de uma resposta imune Th1 predominante, caracterizada pela produção de IFN- γ e TNF por células T CD4+ e CD8+, ativa macrófagos infectados para matar parasitas intracelulares via produção de NO, enquanto respostas de células Th2 e Treg demonstram promover sua sobrevivência. Nesta representação esquemática é possível verificar também os mecanismos de sinalização envolvidos na expressão do HIV-1 mediada por lipofosfoglicano de *Leishmania* em macrófagos via NF- κ B.

Ademais, a IL-10 e IL-4 afeta a produção de IL-12 prejudicando a diferenciação na subpopulação Th1 e estão envolvidas na modulação de diferentes fatores de superfície celular hospedeira e apresentação de antígenos (MITTAL *et al.*, 2015). Foi demonstrado que a IL-10 atua prejudicando a expressão de moléculas coestimulatórias (CD80, CD86, CD40), bem como a regulação da exocitose e reciclagem do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em células apresentadoras de antígenos (APCs); resultando em respostas de células T prejudicadas (MITTAL *et al.*, 2015; SARAIVA; VIEIRA; O'GARRA, 2020).

Segundo Maksoud *et al.* (2022), a coinfeção viral e parasitária exacerba a

replicação e a infectividade do vírus *in vitro*, através da indução de alterações moleculares na expressão de CXCR4 e CCR5 na membrana celular que atuam como correceptores para o HIV. A regulação positiva desses receptores na coinfeção HIV/*Plasmodium falciparum* (TKACHUK *et al.*, 2001) e HIV/*Mycobacterium tuberculosis* (MAYANJA-KIZZA *et al.*, 2001) mostraram-se associadas à progressão da infecção para Aids (NIGRO *et al.*, 2007). Desta forma, é sugerida que a *L.(L.) donovani* e *L. (L.) infantum* possa desempenhar um papel como aprimorador da progressão da doença (NIGRO *et al.*, 2007; MAKSOUD *et al.*, 2022).

Wolday *et al.* (1999) sugerem que o protozoário atue induzindo a replicação do HIV de maneira antígeno-específica, através do lipofosfoglicano (LPG) expresso em sua superfície (promastigota) (Figura 7). Esse glicoconjugado ativa eventos de sinalização envolvendo várias moléculas, tais como: a proteína quinase A/AMP cíclico (PKA/cAMP), tirosina quinase (PTK), cátion divalente Ca²⁺ e a proteína de ligação ao cálcio Ca²⁺, calmodulina, que resultam no aumento da expressão viral, através de fatores transcricionais, como o fator nuclear kappa-B (NF-kB) (Figura 7). Em células transfectadas com um construto de NF-kB mutado, a expressão do HIV-1 mediado por LPG foi anulada (OLIVIER *et al.*, 2003). Além de favorecer a infecção pelo HIV, diferentes estudos sugerem que o LPG da *Leishmania* spp. atue protegendo o parasita da lise mediada pelo complemento, entretanto mais estudos são necessários para compreender esse mecanismo (FRANCO *et al.*, 2012; ROSSI *et al.*, 2018).

Em sua forma intracelular (amastigota), o protozoário perde a maior parte do LPG em sua superfície, retendo apenas o componente intramembranar (*phosphatidyl inositol core-core PI*). Esse componente, esteve associado à indução do HIV e a sobrevivência intracelular do protozoário através de alterações de eventos de sinalização dependentes da proteína quinase C (PKC). Essas alterações encontram-se relacionadas principalmente à inibição de funções importantes dos macrófagos, como a geração de radicais de oxigênio (ROSSI *et al.*, 2018). Deste modo, esses estudos têm associado a infecção pelo protozoário com a possibilidade de progressão para a Aids, o que reduz a expectativa de vida desses pacientes (MAKSOUD *et al.*, 2022).

Estudos *in vitro* demonstram a relação do HIV com a redução da atividade anti-*Leishmania* de macrófagos, implicando no aumento do crescimento intracelular

de *L. (L.) donovani* (MAKSOUUD *et al.*, 2022) e *L. (L.) infantum* (ZHAO *et al.*, 2006); quando comparado com os macrófagos sem o vírus. Ademais, foi visto complicações graves atreladas a uma alta carga parasitária de *L. (L.) infantum* em pacientes com Aids na Espanha (LOPEZ-VELEZ *et al.*, 1998; BOSSOLASCO *et al.*, 2003). Esses estudos, demonstraram que uma proporção considerável de pacientes coinfetados apresentam parasitemia periférica, com a presença de amastigotas quiescentes de *Leishmania* spp. em locais incomuns de baixa exposição aos fármacos, como, a glândula adrenal (RANI *et al.*, 2021), trato gastrointestinal (CIPRIANO *et al.*, 2017), miocárdio (FARINA *et al.*, 2022), líquido pleural (CECCARELLI *et al.*, 2018) e mucosa nasal (CIPRIANO *et al.*, 2017), o que pode explicar as prevalentes recaídas ocorridas neste grupo. Esses relatos apoiam a hipótese de que os distúrbios imunológicos causados pelo HIV são particularmente favoráveis para a multiplicação do parasita, que por sua vez, exacerbam ainda mais o microambiente Th2, influenciando a progressão da doença (EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010).

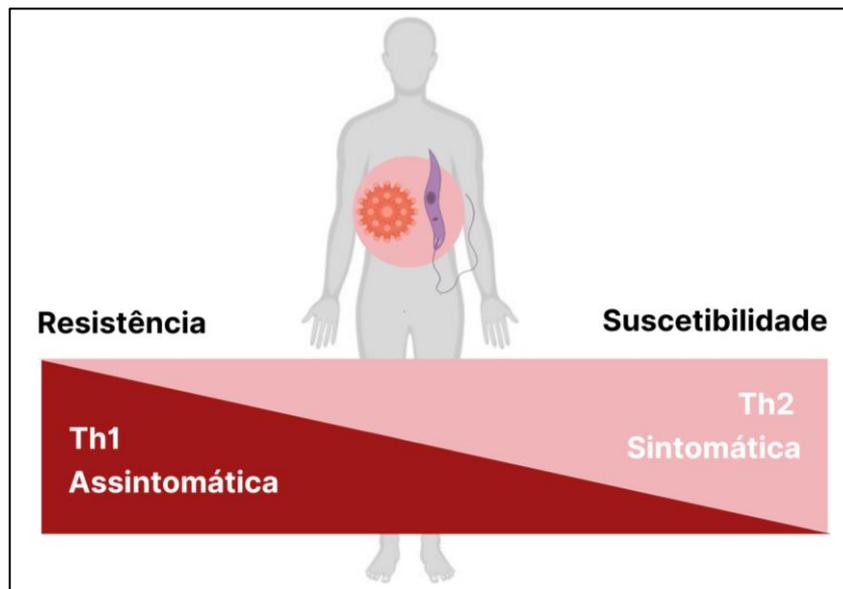
Assim, a alta parasitemia estaria relacionada com a anergia celular, principalmente dos macrófagos, induzido pelo HIV (OKWOR; UZONNA, 2013). A proteína de transativação de HIV-1, denominada *Tat*, esteve associada a inibição do efeito leishmanicida induzido pelo IFN- γ , bem como o aumento da expressão de diferentes moléculas como a prostaglandina E2 (PGE2), cicloxigenase 2 (COX-2) e TGF-B, em macrófagos por análises *in vitro*. A neutralização da proteína viral, assim como da COX-2 e TGF-B, reduziu o crescimento do protozoário, demonstrando que o vírus, gera um ambiente permissivo à replicação da *Leishmania* (BARRETO-DE-SOUZA *et al.*, 2006).

Assim, a infecção pelo HIV, que tende a deprimir a atividade das células Th1, pode resultar na reativação da infecção latente por *Leishmania* spp., resultando em doença aparente. Ao passo que, os defeitos na resposta Th1 em pessoas já infectadas pelo HIV pode favorecer o estabelecimento de uma infecção primária sintomática por *Leishmania* spp. (COTA; SOUSA; RABELLO, 2011; OKWOR; UZONNA, 2013). Na figura 8, é possível observar essa relação de suscetibilidade e resistência à infecção associado à condição clínica do indivíduo.

Esses achados corroboram a ideia de que ambos os agentes infecciosos (*Leishmania* spp. e HIV) de maneira sinérgica ocasionam uma disfunção imunológica; desempenhando um importante papel na patogênese e na progressão

de ambas as infecções LV e HIV. Conseqüentemente, é verificado o aparecimento de manifestações atípicas, podendo ser fatal para o paciente (CIPRIANO *et al.*, 2017). Portanto, uma melhor compreensão da resposta imunológica referente a infecção por ambos os parasitas é crucial para o estabelecimento de abordagens profiláticas e terapêuticas (ADRIAENSEN *et al.*, 2018a).

Figura 8 - Manifestação clínica na coinfeção por *Leishmania* spp. e HIV em decorrência da resposta imunológica.



Fonte: O autor.

Nota: A figura mostra as diferentes condições clínicas apresentadas por indivíduos com coinfeção LV/HIV associado a predominância do perfil Th1 ou Th2.

2.2.2 Aspectos clínicos e tratamento

Em pessoas infectadas pelo HIV, as manifestações clínicas típicas da LV podem ser semelhantes às apresentadas por aqueles imunocompetentes. Assim, os indivíduos podem apresentar inicialmente febre, palidez cutâneo-mucosa e esplenomegalia discreta, sendo mais expressiva que a hepatomegalia, associados à fadiga e emagrecimento (BRASIL, 2015). Com a evolução da doença, os pacientes podem apresentar distensão e dor abdominal, em consequência do agravamento da hepatoesplenomegalia, bem como pancitopenia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. Em fase crônica, há desnutrição proteico-energética severa, com evolução para caquexia e morte em poucas semanas ou meses (BRASIL, 2015).

Em quadros de coinfeção LV/HIV, algumas particularidades podem ser

observadas; como a ocorrência de febre e hepatoesplenomegalia em menor frequência, podendo ser observado em maiores proporções fraqueza, tosse, desnutrição e perda de peso. Ademais, sintomas gastrointestinais são amplamente verificados, bem como fenômenos hemorrágicos em quase um terço desses pacientes, e aumento de linfonodos (LIMA *et al.*, 2013; LINDOSO *et al.*, 2014; COUTINHO *et al.*, 2017).

Essas manifestações atípicas são observadas em pacientes que apresentam contagens CD4 significativamente reduzidas, propiciando a disseminação de amastigotas para sítios incomuns (DIRO *et al.*, 2015; CIPRIANO *et al.*, 2017). Esses fenômenos, em contraste a sintomatologia clássica que define a suspeita da LV pela OMS (febre, emagrecimento e esplenomegalia) (WHO *et al.*, 2010), contribuem para a permanência de casos sem diagnóstico e tratamento ou com substancial atraso, uma vez que outras infecções oportunistas são consideradas; culminado em pior prognóstico, com maiores possibilidades de letalidade quando comparado aos indivíduos não infectados pelo HIV (DIRO *et al.*, 2015; CECCARELLI *et al.*, 2018). Além disto, muitos indivíduos permanecem assintomáticos para a LV (90%), impossibilitando a suspeita clínica e o diagnóstico. Embora aparentemente saudáveis, são potenciais reservatórios de transmissão, tornando-se um desafio para os programas de controle da doença (BOTANA *et al.*, 2019).

O tratamento da LV quando associada a infecção pelo HIV permanece um desafio, dada a baixa resposta terapêutica verificada, altas taxas de recidivas, e maiores números de óbitos (BURZA *et al.*, 2014). Além disso, a terapia medicamentosa utilizada, se encontra associada a uma significativa toxicidade, haja vista as ocorrentes reações adversas graves verificadas nestes pacientes, interferindo na adesão ao tratamento (SILVA *et al.*, 2013; MAZIRE; AGARWAL; ROY, 2021).

Os quimioterápicos utilizados no tratamento da LV na condição de coinfeção se constituem nos mesmos utilizados por aqueles imunocompetentes. Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (2019), a droga de primeira escolha utilizada na LV/HIV é o desoxicolato de anfotericina B. As alternativas terapêuticas incluem a anfotericina B lipossomal (LamB), o isotionato de pentamidina e antimoniato de N-metil glucamina. Esses medicamentos utilizados de forma combinada fornecem menores possibilidades de falência terapêutica e maiores possibilidades de cura, do que quando administrados em monoterapia (ABONGOMERA *et al.*, 2018). Além

disso, alguns autores demonstram a efetividade e a viabilidade de uma profilaxia secundária após a cura parasitológica sob a taxa de recidivas (DIRO *et al.*, 2018; LINDOSO *et al.*, 2018), uma vez que é frequente em indivíduos LV/HIV (SILVA *et al.*, 2013).

Lima *et al.* (2019) ao comparar a eficácia do tratamento entre dois grupos, LV/HIV-126 e LV-126, verificaram recidivas 36,5% entre os coinfectados, atrelado a uma maior letalidade (LV/HIV: 11,1%, LV: 2,4%). Esses dados são consistentes ao observado em outros estudos para esses grupos, o qual foi verificado uma taxa de letalidade variando de 8,7% - 23,5% para a LV/HIV, bem como a de recidivas (10,0% - 56,5%) (COTA *et al.* 2014; LINDOSO *et al.*, 2014).

Assim, novas orientações para o diagnóstico clínico da LV em quadros de coinfeção é de extrema urgência e importância a nível de saúde pública. É necessário haver a inclusão de lesões atípicas de LV e considerar a mesma no diagnóstico diferencial de linfadenopatias, lesões orais, úlceras gastrointestinais, entre outras complicações em pacientes com HIV para um manejo adequado, visando a redução da letalidade (DIRO *et al.*, 2015). Ademais, é essencial considerar a possibilidade de infecção por *Leishmania* spp. em indivíduos assintomáticos, principalmente naqueles que vivem em áreas endêmicas para a LV e no acompanhamento daqueles com HIV, visto as possibilidades de ativação e recidivas para a doença (SILVA *et al.*, 2013; BOTANA *et al.*, 2019). Para tal, é fundamental o envolvimento de profissionais de saúde neste processo que tratam rotineiramente pacientes com coinfeção LV/HIV (DIRO *et al.*, 2015).

2.2.3 Diagnóstico laboratorial

Na rotina médica o diagnóstico da leishmaniose visceral é confirmado por exames laboratoriais após suspeita clínica. Seguindo esse contexto, a identificação de indivíduos assintomáticos para LV e especialmente àqueles coinfectados pelo HIV, torna-se um desafio para os programas de controle da doença, devido a ausência de sinais clínicos. Outros fatores que colaboram para o diagnóstico tardio são a inacessibilidade dos testes de LV aos pacientes em várias áreas endêmicas, e os resultados laboratoriais falsos negativos, contribuindo para a manutenção do ciclo de transmissão e aumento do número de casos (VAN GRIENSVEN *et al.*, 2019).

O diagnóstico laboratorial para o HIV (testes rápidos TR1, TR2, ELISA e/ou, imunoblot, dados sobre a carga viral e contagem de linfócitos T CD4+) encontra-se

bem estabelecido; contudo, o diagnóstico da LV, principalmente em casos de coinfeção com HIV é quase sempre difícil ou impreciso (SINGH, 2014; BOTANA *et al.*, 2019). Sabe-se que os diferentes testes laboratoriais empregados para LV não são 100% sensíveis e específicos e, parte deles, permanecem inacessíveis às áreas remotas e endêmicas para a doença. Além disso, nas áreas não endêmicas, os testes de LV não são solicitados, uma vez que outras doenças são consideradas como primeira hipótese diagnóstica (SINGH, 2014).

Segundo o Ministério da Saúde (2015) a confirmação da LV entre casos com HIV se dá pela positividade obtida em um ou mais métodos diagnósticos: parasitológico, imunológico e molecular. O parasitológico é considerado “padrão ouro” no diagnóstico, pois fornece uma elevada sensibilidade e especificidade através da identificação direta do parasito em aspirados teciduais do baço, medula óssea, fígado e linfonodos. Na coinfeção LV/HIV, diante da alta parasitemia verificada como resultado do comprometimento imunológico, este método, torna-se ainda mais eficaz (COTA *et al.*, 2013). No entanto, a punção para coleta destes tecidos é extremamente invasiva, necessitando de ambiente apropriado e de profissionais especializados para a realização do procedimento. Além disto, culturas de *Leishmania* spp. obtidas de biópsias teciduais, células mononucleares de sangue periférico e sangue total, bem como inoculação animal podem ser realizadas no intuito melhorar a sensibilidade no diagnóstico da LV; contudo, encontram-se restritos a locais de referência, o que dificulta a expansão e a descentralização do diagnóstico em ambientes com recursos limitados (CASTELLI *et al.*, 2021). Desta forma, é geralmente solicitado diante de resultados negativos para a sorologia, atrelada a suspeita clínica, ou em pacientes diagnosticados, mas que não respondem ao tratamento empregado (SINGH; SUNDAR, 2015).

Os métodos imunológicos e moleculares se destacam pela sensibilidade, especificidade e baixa invasividade ao paciente (VIEIRA *et al.*, 2021). Em relação ao método imunológico (Quadro 2), estes estão fundamentados na (i) detecção de respostas celulares, como a reação de montenegro (IDRM); (ii) em ensaios baseados em anticorpos específicos do parasita; tais como, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), teste rápido imunocromatográfico (rk39-ICT) e de aglutinação direta (DAT) e (iii) na detecção de antígenos, incluindo o teste de aglutinação em látex (KAtex) (COTA *et al.*, 2012).

Quadro 2 - Principais testes imunológicos utilizados no diagnóstico da Leishmaniose visceral.

Testes de diagnóstico imunológico	Princípio do teste	refs
IDRM	Extrato solúvel de <i>Leishmania</i> é administrada por via intradérmica no antebraço, o qual posteriormente é medida o diâmetro das endureções formadas, sendo considerado positivo aquelas com diâmetro superior a 5mm. Geralmente só positivam após cura clínica.	Brasil, 2015
rk39-ICT	O teste rápido imunocromatográfico, baseado no antígeno recombinante k39 é derivado de uma proteína com repetição de 39 aminoácidos de <i>L. donovani</i> . A partir de sua utilização é possível detectar resposta imune específica ao parasita através da detecção dos anticorpos anti- <i>Leishmania</i> . Este teste fornece resultados qualitativos, de rápida leitura, sendo adequado seu emprego em campo como ferramenta de diagnóstico.	Freire <i>et al.</i> , 2018
RIFI	A Reação de imunofluorescência indireta é utilizada para a detecção de anticorpos que formam conjugados. Normalmente só positivam após cura clínica com antígenos impregnados em lâminas. Reações positivas para LV envolve diluição igual ou superior a 1:80.	Freire <i>et al.</i> , 2020; Srivastava <i>et al.</i> , 2011
ELISA	É um ensaio quantitativo fundamentado na formação do complexo antígeno-anticorpo, visualizado a partir de reações enzimáticas. Comumente, antígenos do patógeno são adsorvidos em um suporte sólido que reagirá com anticorpos presentes nas amostras biológicas adicionadas.	Freire <i>et al.</i> , 2018
DAT	Ensaio baseado na aglutinação de promastigotas de <i>Leishmania</i> com anticorpos anti- <i>Leishmania</i> presentes em amostras de soro, plasma ou sangue de pacientes.	Freire <i>et al.</i> , 2020;
KAtex	Teste que detecta antígenos em amostras de urina.	Ghatei <i>et al.</i> , 2009.

Ensaio baseado na pesquisa de anticorpos são reconhecidamente pouco sensíveis em indivíduos com coinfeção LV/HIV, em função da disfunção imunológica verificada - linfócitos T e B (COTA *et al.*, 2012). Nestes indivíduos, os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* encontram-se reduzidos, e, apenas 40 a 50% dos casos apresentam sorologia positiva, devendo-se o resultado ser analisado com cautela (LINDOSO *et al.*, 2018). Além disso, apresentam-se limitados na diferenciação de infecções recentes, ou passadas; assintomática e na detecção de recidivas, devido à presença prolongada de anticorpos após a cura clínica; e no prognóstico do caso (SUNDAR; SINGH, 2018; BOTANA *et al.*, 2019).

Um estudo de revisão sistemática e metanálise revelou a acurácia dos

principais métodos sorológicos de diagnóstico da LV em infectados pelo HIV, considerando a variabilidade dos testes em diferentes áreas (COTA *et al.*, 2012). De maneira geral, as sensibilidades estimadas com seus respectivos intervalos de confiança (95%) foram: DAT: 81% (61-95%), ELISA: 66% (40-88%) e RIFI: 51% (43-58%). Portanto, diante dos valores apresentados, Cota *et al.* (2012) sugerem que os testes sorológicos não devem ser utilizados para descartar o diagnóstico de LV entre os infectados pelo HIV; no entanto, ao menos uma reativação em um teste, possui valor diagnóstico quando combinado a avaliação clínica.

Freire *et al.* (2019) ao avaliarem os testes sorológicos com pesquisa de anticorpo (RIFI, ELISA, rK39-ICT, DAT) para a LV, confirmaram diferenças nos desempenhos deles no Brasil. Esses achados realçam que a recomendação destes testes como uma das principais estratégias diagnósticas do programa nacional para a redução da letalidade, precisam ser qualificados com informações específicas sobre o desempenho, uma vez que não há consenso sobre as taxas mínimas de sensibilidade e especificidade necessárias para um teste diagnóstico de LV. Segundo Boelaert *et al.* (2007), para um teste de triagem, deveriam ser exigidas sensibilidade e especificidade mínima entre 95% e 98%, respectivamente. Considerando esse mesmo autor, os resultados verificados por Cota *et al.* (2012) e Freire *et al.* (2019) não foram satisfatórios. Além disso, Freire *et al.* (2019) apontam a infecção pelo HIV como o fator mais significativo na variação dos resultados dos testes entre diferentes populações, sendo observada uma grande quantidade de falso-negativos. Além disso, se mostram ineficientes em identificar indivíduos com LV assintomática, como verificado por Cota *et al.* (2013) e Botana *et al.* (2019), contribuindo para o ciclo de transmissão. Nesse sentido, surgem questionamentos acerca da adequação dos exames atuais como ferramentas de triagem e até mesmo como “*follow-up*” da LV (FREIRE *et al.*, 2019).

Por sua vez, em áreas de alta prevalência de coinfeção LV/HIV, o KAtex tem se mostrado sensível na detecção de antígenos presentes em urina de pacientes com LV/HIV (WHO, 2010). Na Etiópia, este teste apresentou sensibilidade de 86% e especificidade de 99% (VOGT *et al.*, 2018). Resultados semelhantes foram verificados em outros locais endêmicos, como na Espanha (sensibilidade: 86-100% e especificidade: 95-100%) (VILAPLANA *et al.*, 2004; RIERA *et al.*, 2004) e Sudão (sensibilidade: 100% e especificidade:100%) (EL-SAFI *et al.*, 2003). No Brasil, Cavalcanti *et al.* (2012) verificaram a positividade em quatro dos cinco pacientes

LV/HIV. Em outro estudo desenvolvido no país, cinco de sete pacientes coinfectados também forneceram positividade para o KAtex (BARBOSA-JÚNIOR *et al.*, 2015). Em teoria, este teste forneceria dados mais sensíveis, uma vez que os níveis de antígenos correlacionam com a elevada carga parasitária observada nos pacientes LV/HIV (SINGH, 2014). No entanto, em Pernambuco a prevalência de coinfeção LV/HIV foi menor quando considerado os resultados obtidos por KAtex quando comparado a outros testes de diagnóstico (DAT, ELISA, PCR), em pacientes hospitalizados em serviços de referência para doenças infecciosas em Pernambuco (GUEDES *et al.*, 2018) e entre indivíduos assintomáticos à nível ambulatorial, sendo necessários novas investigações envolvendo esse teste.

Com o advento da biologia molecular, testes baseados na detecção de sequências específicas de DNA e/ou RNA de agentes etiológicos, mostram-se promissores tanto em imunocompetentes, quanto em infectados pelo HIV. Em geral, os métodos moleculares fornecem alta sensibilidade e especificidade, com desempenho de excelência no diagnóstico e em casos suspeitos de recidivas (Quadro 3) (SUNDAR; SINGH, 2018; VIEIRA *et al.*, 2021).

Quadro 3 - Principais testes moleculares utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral.

Teste de diagnóstico molecular	Princípio do teste	refs
PCR	A reação em cadeia da polimerase permite a amplificação de sequências específicas de DNA do parasito através da utilização de <i>primers</i> , que se ligam na sequência, como um iniciador, possibilitando a amplificação.	Neves <i>et al.</i> , 2016
qPCR	A reação em cadeia da polimerase quantitativa permite o monitoramento contínuo do processo de amplificação da sequência de DNA do parasito, através de sondas fluorescentes.	Neves <i>et al.</i> , 2016
nestedPCR	O seu princípio é o mesmo da PCR, o que diferencia é a origem da amostra. Neste, a amostra compreende o produto de uma PCR anterior, no intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade. Deste modo, a nested representa a PCR do produto da PCR.	Neves <i>et al.</i> , 2016
RT-PCR	A reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa permite a detecção de sequências de RNA do parasita através do processo de conversão em DNA complementar pela enzima transcriptase reversa, sendo posteriormente amplificado.	Botana <i>et al.</i> , 2019

As sequências de alvos de *Leishmania* spp. mais comumente utilizadas incluem: gene da subunidade ribossômica (*SSU rRNA*) (COTA *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2014), 18S-rRNA (BLACKWELL; FAKIOLA; SINGH, 2020); kDNA (AVELAR; CARVALHO; RABELLO, 2019); regiões espaçadoras de transcrito interno (ITS) e genes mini-exon (KHAN *et al.*, 2014). O ensaio baseado nessas sequências da reação em cadeia polimerase (PCR), permite a identificação do DNA de *Leishmania* spp. antes do aparecimento dos sinais e sintomas clínicos, além de rapidez de execução e capacidade de trabalhar com uma grande variedade e quantidade de amostras clínicas (VIEIRA *et al.*, 2021). Além disto, em alguns estudos, este ensaio mostrou-se útil na identificação de indivíduos assintomáticos para a LV e positivos para o HIV, uma vez que o diagnóstico sorológico não é confiável e o parasitológico é altamente invasivo (SUNDAR; SINGH, 2018). García-García *et al.* (2006), identificaram na Espanha através da PCR, o kDNA de *L.(L) infantum* em indivíduos assintomáticos LV/HIV; diante de resultados negativos para os testes ELISA, *Western blotting* e LST. Guedes *et al.* (2018, 2021) em seus trabalhos verificaram uma prevalência de 3,9% para indivíduos internados LV/HIV e de 2,28% para assintomáticos, baseados em PCR com alvo kDNA, demonstrando ser uma importante ferramenta para a identificação desses indivíduos.

Apesar de bons resultados para a identificação de infecção por *Leishmania* spp. a partir de métodos moleculares como a PCR, outros trabalhos trazem evidências da eficiência limitada em algumas regiões endêmicas para a doença. Na Espanha, Botana *et al.*, (2019) verificaram resultados negativos para PCR com alvo *SSU rRNA* em amostras obtidas de pacientes assintomáticos LV/HIV; apresentando resultados positivos apenas os casos do teste de proliferação celular (CPA) reagentes. Segundo Ibarra, Moreno e Carrillo (2019), a limitação deste teste pode ser decorrente da baixa parasitemia verificada nestes indivíduos. Além disto, as diferenças dos valores referentes a sensibilidade e especificidade do diagnóstico molecular, podem estar relacionados com as variações nos protocolos empregados, uma vez que a sensibilidade se encontra associada a diferentes fatores, tais como: a natureza da amostra biológica, os *primers* utilizados na amplificação das sequências alvos, o método de extração de DNA e o manuseio da amostra (contaminações) (VIEIRA *et al.*, 2021).

Ao longo dos anos, surgiram variações da técnica da PCR, e, dentre elas, a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), tem-se destacado por gerar

resultados rápidos, através da análise de sinais fluorescentes produzidos durante as amplificações; e as baixas possibilidades de contaminação, pela ausência da necessidade de manuseio de amostras após o ensaio (CASTELLI *et al.*, 2021). Em contraste a PCR convencional (qualitativa), a qPCR permite a quantificação do DNA circulante do parasita e, deste modo, sua utilização é significativa para o diagnóstico, monitoramento do resultado clínico e identificação de possíveis recaídas pós-tratamento (WU *et al.*, 2020).

Em estudo desenvolvido por Castelli *et al.* (2021), a qPCR mostrou-se altamente sensível e específico na detecção e quantificação de carga parasitária consideravelmente baixa de *L. (L.) infantum* em amostras de pacientes previamente negativos para RIFI, cultura e microscopia histológica. Em coinfectados, Cota *et al.* (2013) verificaram sensibilidade similar da qPCR, utilizando-se amostras sanguíneas (com base no alvo SSUrRNA) ao teste parasitológico empregado (exame direto e cultura de aspirados teciduais), demonstrando ser uma estratégia alternativa menos invasiva para a confirmação de casos de coinfeção. No entanto, apesar de tais benefícios, os custos associados à preparação do ensaio e equipamentos são limitantes para sua realização, principalmente em regiões remotas (BARBOSA-JÚNIOR *et al.*, 2015).

Em contrapartida, a amplificação isotérmica mediada por Loop (LAMP) é uma técnica que se mostra promissora nesse sentido, uma vez que traz como perspectiva a possibilidade de ser utilizada em locais de ponto atendimento, dada a sua simplicidade e baixo custo, atrelado a alta sensibilidade e especificidade (BEZERRA *et al.*, 2020). Em estudo desenvolvido na Etiópia, o ensaio LAMP baseado em 18S rRNA e kDNA, mostrou-se rápido e preciso no diagnóstico da LV ao identificar 117/122 casos confirmados. Além disso, apresentou uma sensibilidade de 100%, com positividade para todos os 23 pacientes com coinfeção LV/HIV (HAGOS *et al.*, 2021). Resultados semelhantes foram verificados na Tailândia por Ruang-Areerate *et al.* (2021), o qual o ensaio demonstrou ser altamente sensível (94,1%) e seletivo (97,1%) da determinação da infecção por *L. (L.) donovani* em pacientes assintomáticos com HIV, através de indicadores duplos (sonda SYBR green I e nanopartícula de ouro – AuNP).

Diante das informações supracitadas, é evidente que nenhum método atualmente disponível apresenta todas as características desejáveis para o diagnóstico de LV/HIV, incluindo a alta sensibilidade, especificidade, facilidade de

acesso e baixo custo. Desta forma, há necessidade do uso de diferentes métodos e principalmente de novas estratégias descentralizadas, que possam contribuir em maiores taxas de positividade no diagnóstico, favorecendo o manejo adequado desses indivíduos e as ações de controle para a doença (MANN *et al.*, 2021).

2.2.4 Biomarcadores imunogenéticos

Nos últimos anos o desenvolvimento de estudos que envolvam biomarcadores é crescente, dado a perspectiva de sua utilização na prática clínica envolvendo o diagnóstico, prognóstico e como preditores de recidivas (Figura 9) (IBARRA-MENESES; MORENO; CARRILLO, 2019). Além disso, são úteis no entendimento dos mecanismos relacionados às doenças, contribuindo também para identificação de possíveis novos alvos terapêuticos.

Figura 9 - Aplicabilidade de biomarcadores.



Fonte: O autor.

Um grupo de trabalho da National Institutes of Health nos Estados Unidos, definiu biomarcador como “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica” (Biomarkers Definitions Working, 2001). Dentre essas, características imunológicas e

moleculares são continuamente avaliadas.

Do ponto de vista imunológico, diferentes citocinas relacionadas à suscetibilidade ou a resistência à *Leishmania* spp. em pacientes com HIV apresentam-se elevadas. Entre os pacientes LV/HIV foi verificado níveis significativamente aumentados de TNF, IL-4 (BARBOSA-JÚNIOR *et al.*, 2020b), IFN- γ , MIG, IP-10, IL-2 (BOTANA *et al.*, 2019), CCL3 e CCL4 (SISAY *et al.*, 2011), quando comparado com os casos mono infectados HIV, indicando que a *Leishmania* spp. pode modular a produção dessas moléculas em caso de coinfeção. Uma vez elevadas, estas citocinas e quimiocinas poderiam ser direcionadas como importantes biomarcadores, principalmente em pacientes sem evidência clínica para a doença. Botana *et al.* (2019) sugeriram que as citocinas IFN- γ , IL-2 e MIG, seriam importantes moléculas para identificação de indivíduos assintomáticos LV/HIV, sobre o qual nenhum dos testes moleculares e sorológicos utilizados, foram capazes de detectar o DNA de *L. (L.) infantum* ou anticorpos anti-*Leishmania* em amostras de sangue periférico desses pacientes, respectivamente.

Outros trabalhos caracterizaram o IFN- γ como um importante biomarcador de infecção assintomática e naqueles curados para LV (GIDWANI *et al.*, 2011; IBARRA-MENESES *et al.*, 2016; ADEM *et al.*, 2016). Em suma, este biomarcador estaria relacionado a uma resposta imunológica efetiva do hospedeiro contra o parasita. Alguns destes trabalhos, também propõem IL-2, IP-10, MIG, CCL2 e CXCL8 como biomarcadores de infecção, exposição e cura em áreas endêmicas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* (IBARRA-MENESES *et al.*, 2017a,b; IBARRA-MENESES; MORENO; CARRILLO, 2019).

Segundo Ibarra Meneses, Moreno e Carrillo (2019), em diferentes condições de infecção por *L. (L.) infantum* (sintomática, assintomática e cura), é possível observar variações nos níveis de citocinas e quimiocinas que estão associadas a resistência ou suscetibilidade ao desenvolvimento da doença. Há aumento de moléculas relacionadas ao perfil Th1 (MIG, IP-10, IFN- γ , TNF, IL-2, Granzima B) em curados e assintomáticos, estando associadas à imunidade protetora na LV. Em contrapartida, citocinas do tipo Th2, como a IL-10, apresentam-se em maiores concentrações na infecção sintomática (GIDWANI *et al.*, 2011; IBARRA-MENESES *et al.*, 2016, 2017a,b; IBARRA-MENESES; MORENO; CARRILLO, 2019). Esses achados, segundo Ibarra-Meneses, Moreno e Carrillo (2019), são essenciais para o desenho de estudos epidemiológicos e em ensaios clínicos para a LV, uma vez que

os métodos usualmente empregados são insatisfatórios e novas abordagens envolvendo biomarcadores precisam ser exploradas.

Adriaensen *et al.* (2018b) relataram entre os casos LV/HIV níveis séricos diminuídos de sCD40L (*soluble CD40 ligand*) nos sintomáticos e níveis aumentados nos assintomáticos. Esta glicoproteína atua na ativação de células que expressam CD40, como macrófagos, e promove a secreção de citocinas pró-inflamatórias e síntese de óxido nítrico. Assim, em indivíduos capazes de montar e/ou manter uma resposta imune celular (assintomáticos), a via CD40-CD40L seria acentuada, dado ao seu importante papel na resistência ao parasita (ADRIAENSEN *et al.*, 2018b). Esses autores também sugerem um valor clínico à neopterinina (composto de pirazino-pirimidina), uma vez que, esta poderia ser avaliada como preditor de evolução clínica de pacientes LV/HIV, visto que se apresentou elevada em indivíduos assintomáticos; estando associada a ativação de macrófagos pós-infecção (ADRIAENSEN *et al.*, 2018b).

As moléculas IFN- γ , TNF estiveram relacionados com a gravidade e sCD14 (*soluble CD14*) com a morte em LV/HIV (FERREIRA *et al.*, 2022). Takele *et al.* (2013) verificou níveis elevados da enzima arginase em pacientes LV/HIV, sendo apontada como um outro importante marcador de gravidade na coinfeção, o qual encontra-se relacionada a níveis mais baixos de L-arginina e respostas T celulares prejudicadas.

Concomitantemente, análises dos níveis de expressão de receptores envolvidos na entrada do HIV nas células induzidas por *Leishmania* spp. podem ser importantes marcadores de progressão para a Aids. A expressão aprimorada dos receptores CCR5 em linfócitos T CD3+ (NIGRO *et al.*, 2007) e em CD8⁺ (VALLEJO *et al.*, 2015) e de CXCR4 em T CD4+ (HAILU *et al.*, 2004) são encontrados em indivíduos LV/HIV, quando comparado aos controles saudáveis. O CCR5 atua como receptor de CCL3 (STRING, 2022), que por sua vez, em níveis aumentados, compete com HIV-1 que se utiliza da CCR5 como co-receptor. Desta forma, a quimiocina CCL3 é um potente alvo no controle da coinfeção LV/HIV contribuindo em processos inflamatórios, com o recrutamento e ativação de células imunes efetoras, bem como dificultando a invasão intracelular pelo HIV (SISAY *et al.*, 2011).

Em paralelo, Sisay *et al.*, (2011) verificaram níveis aumentados da CCL5 e de *Stromal cell-derived factor 1* (SDF-1 α) com associação negativa à carga viral. A partir desses achados, este autor sugere que moléculas como CCL3, CCL4, CCL5 e

SDF-1alpha além de biomarcadores de infecção, poderiam ser utilizadas no contexto da imunoterapia auxiliando a intervenção terapêutica em LV e HIV.

Além desses aspectos, na tentativa de se entender os mecanismos relacionados à resposta imune frente a infecção, pesquisas na área de imunogenética contribuem em novas informações a respeito de genes e mecanismos relacionados à susceptibilidade/resistência do hospedeiro ao parasita (BARBOSA-JÚNIOR *et al.* 2020a,b). Esses estudos possibilitam a identificação de fatores genéticos associados a variadas doenças, podendo sua análise informar o provável desfecho clínico do paciente (WEIRATHER *et al.*, 2016; KWOK; MENTZER; KNIGHT, 2021).

A presença de SNP no gene *solute carrier family 11 member 1* (SLC11A1) (rs3731865), tem efeito na via de ativação do macrófago e, por isso, tem sido objeto de investigação em infecções relacionadas (ARCHER *et al.*, 2015). Barbosa-Júnior *et al.* (2020a) verificaram a associação deste polimorfismo na suscetibilidade à coinfeção LV/HIV em pacientes do Nordeste do Brasil, área endêmica para *L. (L.) infantum*, sendo apontada como um importante marcador genético para a população coinfectada LV/HIV.

O gene da IL-10, localizado no braço longo do cromossomo 1 (Figura 10A), possui vários polimorfismos na região do promotor, interferindo nos níveis de produção da citocina e consequentemente afetando o equilíbrio Th1/Th2 (IYER; CHENG, 2012). No estudo realizado por Hajilooi *et al.* (2013), o SNP presente na posição -819 (rs1800871), foi significativamente associado à LV. Segundo esses autores, os alelos do SNP rs1800871 em heterozigose aumentaria a suscetibilidade à LV em indivíduos soronegativos saudáveis (OR=10,21; IC 95% 2,32–44,90; $p=2e-04$) e soropositivos assintomáticos para LV (OR=6,22; IC 95% 1,01–38; $p<0,0001$).

Para Salhi *et al.* (2008), esse genótipo está associado com a regulação positiva da IL-10, posto que, relaciona-se a novos sítios de ligação de fatores de transcrição. A desregulação desta interleucina a níveis aumentados, promoveria a supressão da resposta inflamatória protetora contra a *Leishmania* spp., e a suscetibilidade à doença. Estudos envolvendo outras doenças, como a Hepatite B (WANG *et al.*, 2012) e a Hepatite C (AFZAL *et al.*, 2011) apresentaram resultados semelhantes, corroborando a associação deste SNP à ocorrência e desenvolvimento de doenças infecciosas virais.

A galectina-3 (Gal-3) é uma lectina de ligação ao B-galactosídeo, importante em inúmeras atividades biológicas, incluindo a proliferação celular, regulação apoptótica, inflamação e fibrose (HARA *et al.*, 2020). Por meio desses mecanismos, a Gal-3 passou a ser reconhecida como uma importante molécula na resposta imunológica do hospedeiro contra vários agentes infecciosos, e, inferida como potencial biomarcador com valor clínico (DATTA *et al.*, 2019; LIAO *et al.*, 2020). Datta *et al.* (2019) verificaram aumentos significativos ($p < 0,001$) dos níveis circulatórios de Gal-3 com expressão aumentada de sítios de ligação na molécula, bem como sua correlação com as frequências de células mononucleares e citocinas IFN- γ e IL-10 nos sítios de infecção, demonstrando seu envolvimento na patogênese da leishmaniose dérmica pós-calazar.

Variações nos níveis circulantes dessa molécula pode ser explicada pela presença de polimorfismos no gene *LGALS3* (localizado no cromossomo 14, Figura 10B). O SNP presente na posição +191 no *LGALS3* (rs4644), corresponde a uma mutação missense, caracterizado pela mudança de uma única base (Citosina>Adenina), responsável pela mudança dos aminoácidos Prolina>Histidina da proteína resultante. Através de análises *in silico* realizadas por Furuya *et al.* (2018), essa substituição demonstrou ser potencialmente deletéria para a função da proteína.

Em estudos anteriores, este SNP esteve associado à suscetibilidade à infecções frequentes do trato respiratório em crianças com anemia falciforme (BELMONT *et al.*, 2016), cardiomiopatia dilatada (ZHANG *et al.*, 2018) e à progressão de câncer gástrico (FURUYA *et al.*, 2018).

Figura 10 - Ideograma do cromossomo 1 (A) e cromossomo 14 (B).



Nota: Em A, a seta indica a posição do gene *IL10* (1q32.1). Em B a seta indica a posição do gene *LGALS3* (14q21-q22).

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/>. Acesso: 10 jan. 2023.

Embora, os polimorfismos tenham papéis significativos na suscetibilidade à LV, estudos com esta temática envolvendo pacientes com LV/HIV são escassos.

Esses estudos são de fundamental importância para a elucidação de aspectos relacionados à coinfeção, uma vez que pacientes nesta condição podem apresentar características genéticas e imunológicas diferentes das apresentadas em monoinfeção (BARBOSA-JÚNIOR *et al.*, 2020a,b).

3 JUSTIFICATIVA

A LV é considerada uma das doenças prioritárias do século XXI, pelo fato de representar uma das principais causas de morbidade e mortalidade e ser emergente em indivíduos portadores do HIV. Em Pernambuco, a LV/HIV é prevalente em 16,9% entre os pacientes internos e 9,11% entre os indivíduos com HIV com atendimento ambulatorial (GUEDES *et al.*, 2018; 2021). Por isso, foi incluída como prioritária pelo SANAR, no intuito de reduzir a incidência de novos casos e letalidade para a LV por meio de ações estratégicas em municípios prioritários.

O desenvolvimento de novas estratégias que contribuam na identificação e no manejo adequado dos casos de coinfeção LV/HIV é de extrema necessidade, visto a dificuldade de diagnóstico e as elevadas possibilidades de falha terapêutica e recidivas, internamentos e mortalidade.

Assim, biomarcadores imunológicos e genéticos são investigados para esta abordagem, visto que sua avaliação tem sido considerada promissora na prática clínica. Portanto, o presente estudo avalia moléculas imunológicas MIG, IP-10, CCL2, CCL5, CXCL8 e polimorfismos *LGALS3* (rs4644) e *IL-10* (rs1800871) na condição de coinfeção LV/HIV, uma vez que os estudos relacionados a estas moléculas são escassos. Desta forma, esses resultados são relevantes para promoção da saúde pública, pois contribuirá no esclarecimento de aspectos relacionados à coinfeção e na caracterização de possíveis biomarcadores, auxiliando no melhor manejo clínico dos pacientes LV/HIV, e, portanto, favorecerá a redução de eventos adversos e mortalidade; reduzindo as internações hospitalares e óbitos.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Os níveis séricos das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10 e os polimorfismos dos genes *LGALS3* e *IL-10* estão associados com a leishmaniose visceral em indivíduos com HIV?

5 HIPÓTESE

Os níveis séricos das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10 e os polimorfismos dos genes *LGALS3* e *IL-10* estão associados com a leishmaniose visceral em indivíduos com HIV.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar biomarcadores imunogenéticos envolvidos na leishmaniose visceral em pacientes com HIV procedentes do Estado de Pernambuco.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características epidemiológicas e laboratoriais da população estudada;
- Avaliar as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos do gene *LGALS3* (rs4644) e *IL-10* (rs1800871) entre pacientes coinfectados LV/HIV e monoinfectados HIV;
- Determinar os níveis séricos das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10 em pacientes monoinfectados HIV e coinfectados LV/HIV;
- Identificar correlações entre os níveis de quimiocinas e dados laboratoriais entre pacientes coinfectados LV/HIV e monoinfectados HIV;
- Análisar interações proteicas de CCL2, CCL5, CXC8, MIG e IP-10.

7 METODOLOGIA

7.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ (CAAE n°61218816.1.0000.5190).

7.2 DESENHO E ÁREA DE ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, envolvendo pacientes coinfectados LV/HIV e monoinfectados HIV atendidos em serviços do Sistema Único de Saúde de referência para HIV em Pernambuco: Serviço de Atenção Especializada e Centro de Aconselhamento e Testagem do Município de Petrolina; Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Hospital Correia Picanço da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco e o Hospital das Clínicas em Recife. Participaram também deste estudo indivíduos saudáveis (controles negativos) residentes em Pernambuco.

7.3 GRUPOS DE ESTUDO E TESTE DE TRIAGEM

- LV/HIV: Indivíduos de área endêmica com diagnóstico positivo para LV e HIV;
- HIV: Indivíduos de área endêmica com diagnóstico positivo para HIV e negativo para LV;
- Controles negativos: Indivíduos de área endêmica sem sinais e sintomas clínicos, com negatividade para os testes de diagnósticos para a LV e HIV.

O diagnóstico de LV foi definido com base na positividade em um ou mais testes laboratoriais: reação em cadeia da polimerase (PCR) (GUALDA *et al.* 2015), teste de aglutinação direta (DAT) (Royal Tropical Institute, Amsterdam, Holanda), teste rápido imunocromatográfico rK39 (rK39 ICT) (DiaMed-IT LEISH®; DiaMed AG, Cressier-sur-Morat, Suíça), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (ABASS *et al.*, 2013) e teste de aglutinação em látex (KAtex) (Kalon Biological, Guildford, Reino Unido) (BRASIL, 2015). Por sua vez, o diagnóstico de HIV foi realizado no respectivo Serviço de Saúde por meio de testes rápidos (TR1 e TR2) ou teste sorológico ELISA ou imunoblot e dados sobre a carga viral por RT-qPCR (BRASIL, 2018).

7.4 TAMANHO AMOSTRAL

Neste estudo, foram utilizadas 295 amostras de DNA extraídas de sangue total de pacientes com HIV, das quais 99 foram provenientes de pacientes coinfectados LV/HIV (45 sintomáticos e 54 assintomáticos) e 196 de indivíduos monoinfectados pelo HIV. Também foram selecionadas 160 amostras de soro, sendo 90 de pacientes monoinfectados HIV, 53 assintomáticos LV/HIV e 17 controles negativos (CN). As amostras de soro e DNA de pacientes LV/HIV e HIV foram por conveniência, provenientes do biorrepositório do laboratório de doenças transmissíveis.

7.5 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E LABORATORIAL

Dados epidemiológicos e laboratoriais foram obtidos por meio da consulta e análise de fichas com informações de prontuários médicos. Foram investigadas as seguintes variáveis epidemiológicas: idade, sexo, escolaridade e renda, bem como as variáveis laboratoriais: contagem de hemoglobina, leucócitos, neutrófilos, plaquetas, contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+ e carga viral. Todos os pacientes avaliados estavam em uso regular HAART.

7.6 ENSAIO DE GENOTIPAGEM

A determinação dos polimorfismos foi realizada por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), utilizando-se o *QuantStudio 5* (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA), sob as seguintes condições: *Pre-read stage* de 30 segundos a 60°C, *hold stage* de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos (15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C) e um *post-read stage* de 30 segundos a 60°C. Para a genotipagem, foi utilizado o kit *TaqMan® SNP Genotyping Assay* [LGALS3 (ID C__7593635_1) IL-10 (C__1747362_10)], constituído por sondas marcadas com fluorocromos desenhadas especificamente para complementar os alelos em estudo. Os SNPs dos genes estão descritos no Quadro 4.

Quadro 4 - Polimorfismos genéticos de *LGALS3* e *IL-10*.

Gene	ID	Número de identificação do SNP
<i>LGALS3</i>	C_7593635_1	(rs4644)
<i>IL-10</i>	C_1747362_10	(rs1800871)

Fonte: Thermo Fisher Scientific (2021).

7.7 QUANTIFICAÇÃO DE QUIMIOCINAS

As quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10 foram quantificadas em amostras soro a partir do sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) da Becton Dickinson-BD kit *Human Chemokine* (BD Biosciences), seguindo as recomendações do fabricante. Os dados foram adquiridos por meio do citômetro de fluxo *FACSCalibur™* e analisados pelo *software FCAP Array* (v.3.0). Os níveis das quimiocinas investigadas foram expressas em pg/mL e os respectivos limites de detecção encontram-se apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 - Limite de detecção das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10.

Quimiocinas	Limite de detecção (pg/mL)
CCL2	2.7
CCL5	1.0
CXCL8	0.2
MIG	2.5
IP-10	2.8

Fonte: Becton, Dickinson and Company BD Biosciences (2014).

7.8 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Os detalhes relacionados às frequências das variantes dos respectivos SNPs nas populações foram verificados a partir do banco de referência do projeto 1000 genomas (<http://www.ensembl.org/>).

A partir desses dados, populações com frequências semelhantes do alelo variante à população estudada neste estudo foram selecionadas para análise do desequilíbrio de ligação (LD), realizado por meio de ferramentas baseadas na web, associados ao Regulome DB (LDproxy) inseridas na plataforma do National Cancer Institute – Division of Cancer Epidemiology e Genetics (NIH) (https://ldlink.nci.nih.gov/?var=rs3731865&pop=YRI%2BCEU&genome_build=grch37&r2_d=r2&window=500000&collapseTranscript=true&annotate=forge&tab=ldproxy). Para a análise do LD, foram consideradas as populações *Han Chinese in Beijing, China* (CHB), *Japanese in Tokyo, Japão* (JPT), *African* (AFR), *Ad Mixed American* (AMR) para rs4644 e AFR e AMR para rs1800871.

Para análises de redes funcionais de associação de proteínas foi utilizada a plataforma online STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) versão 11.5 (<https://string-db.org>).

7.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do *software GraphPad Prism* (versão 8.0, San Diego, Califórnia, USA). Comparações entre as variáveis categóricas foram realizadas a partir do teste qui-quadrado (X^2). A força da associação entre as variáveis foi estimada pelo *Odds Ratio* (OR), com intervalos de confiança de 95%, sob significância estatística ($p < 0,05$). Para comparação das variáveis contínuas entre dois grupos, foi aplicado o teste *T-Student* ou *Mann-Whitney*. Para análise entre três grupos, foi utilizado o teste *Kruskal Wallis* e o teste de múltiplas comparações *Dunn's*. Correlações entre os níveis das quimiocinas e os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de *Spearman*.

Em relação aos SNPs, as frequências foram avaliadas com base no modelo genotípico (AA vs. Aa vs aa), modelo dominante (AA/Aa vs. aa), modelo recessivo (AA vs. Aa/aa) e alélico (A vs. a) (CLARKE *et al.* 2011). Para verificar se a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado a calculadora online de Michael H. Court (2005–2008) (<http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20%20HW%20calculator.xls>).

8 RESULTADOS

8.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E LABORATORIAIS

A população do estudo foi composta principalmente por indivíduos do sexo masculino, adultos jovens, com renda inferior a um salário mínimo. A faixa etária verificada entre os grupos LV/HIV e HIV foi semelhante, 34 e 35 anos, respectivamente, apresentando diferença significativa quando comparado com a idade média 24 (21-54) dos controles negativos (CN) ($p=0,012$ vs. $p=0,003$, respectivamente). Os grupos de infecção possuem uma renda inferior a R\$ 825,00, enquanto que o grupo CN, em sua maioria, possuem renda superior a esse valor ($p<0,001$). Diferenças significativas também foram verificadas em relação ao nível de escolaridade entre os grupos LV/HIV e HIV vs. CN ($p=0,005$) (Tabela 1).

Em relação aos parâmetros laboratoriais, os valores apresentados pelos grupos LV/HIV e HIV não apresentaram diferenças significativas (Tabela 2).

Tabela 1 - Características epidemiológicas de 53 assintomáticos coinfectedados leishmaniose visceral/HIV, 90 mono infectados HIV e 17 controles negativos (CN).

Características epidemiológicas	LV/HIV n=53	HIV n=90	CN N=17	p
Sexo				
Masculino	35 (66)	54 (60)	8 (47)	
Feminino	18 (34)	36 (40)	9 (53)	0,372
Idade (anos)	34 (18-57) ^a	35 (17-58) ^b	24 (21-54) ^{a,b}	0,012^a;0,003^b
Renda				
<825	43 (81) ^a	65 (72) ^b	1(6) ^{a,b}	
825-1650	8 (15) ^a	23 (26) ^b	12(70) ^{a,b}	
>1650	2 (4) ^a	2 (2) ^b	4(24) ^{a,b}	<0,001^{a,b}
Escolaridade				
0-8	26 (49) ^a	41 (45) ^b	1 (6) ^{a, b}	
>8	27 (51) ^a	49 (55) ^b	16 (94) ^{a,b}	0,005^{a,b}

Teste Qui-quadrado calculado por meio do software *GraphPad Prism* v.8.0.

^aResultado significativo entre os grupos LV/HIV e CN.

^bResultado significativo entre os grupos HIV e CN.

Tabela 2 - Características laboratoriais de 53 assintomáticos coinfectados leishmaniose visceral/HIV e 90 mono infectados HIV.

Características laboratoriais	LV/HIV n=53	HIV n=90	p
Hemoglobina (g/Dl)	13,39 ± 2,142	13,87 ± 1,922	0,200
Leucócitos (células/mm³)	5212 ± 1850	5817 ± 1587	0,055
Neutrófilos (células/mm³)	2452 ± 1222	3038 ± 1265	0,065
Linfócitos T CD4+ (células/mm³)	1919 ± 892,9	1985 ± 843,1	0,756
Linfócitos T CD8+ (células/mm³)	867 (165-2779)	900 (332-3044)	0,190
Plaquetas	253000 (74000-487000)	239000 (125000-636000)	0,983
Carga viral (cópias/mL)			
Indetectável <50	37 (70)	65 (72)	
50-100.000	15 (29)	19 (21)	
>100.000	1 (1)	6 (7)	0,315

Teste Qui-quadrado para variáveis categóricas e *T Student* ou *Mann-Whitney* para variáveis quantitativas, calculado através do *software GraphPad Prism v.8.0*.

8.2 Frequências genóticas e alélicas

As frequências alélicas e genóticas de *LGALS3* (rs4644) e *IL-10* (rs1800871) de pacientes coinfectados LV/HIV e mono infectados HIV são apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Considerando as frequências genóticas fornecidas, a população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para *LGALS3* (rs4644), os seguintes modelos de genótipos foram testados (CC vs. AC vs. AA), dominante (AA vs. CC+AC) e recessivo (CC vs. AA+AC), sendo o alelo C de referência e o A o variante.

Para o *IL-10* (rs1800871), foram testados os modelos de genótipos (AA vs. AG vs. GG), dominante (GG vs. AA+AG) e recessivo (AA vs. GG+AG), sendo o alelo A de referência e o G o variante. Os resultados da análise revelaram a associação do polimorfismo *IL-10* (rs1800871) com a coinfeção LV/HIV. Ademais, o modelo recessivo do rs1800871 foi significativamente associado ao grupo LV/HIV em comparação aos mono infectados HIV (p=0,038; OR 1,840; IC 95% 0,996-3,312), sendo o alelo A responsável por conferir suscetibilidade à LV.

Tabela 3 - Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo do gene *LGALS3* (rs4644), em pacientes coinfectados leishmaniose visceral/HIV e mono infectados HIV.

<i>LGALS3</i> +191 C>A (rs4644)	LV/HIV (n=99)	HIV (n=196)	Modelo genético	<i>p</i>	OR	IC (95%)
Genótipos						
CC	54(55)	103(53)	(CC vs. AC)	0,947	1,017	0,612-1,669
AC	40(40)	75(38)	(AC vs. AA)	0,223	0,520	0,200-0,404
AA	05(5)	18(9)	(AA vs. CC)	0,227	0,529	0,206-1,517
AA+AC	45(45)	93(47)	(CC vs. AA+AC)	0,745	1,083	0,665-1,780
CC+AC	94(94)	178(90)	(AA vs. CC+AC)	0,211	0,526	0,208-1,427
Alelos						
C ^a	148(75)	281(72)	-	-	-	-
A ^b	50(25)	111(28)	(A vs. C)	0,430	0,855	0,578-1,252

Teste Qui-quadrado calculado por meio do *software GraphPad Prism v.8.0.*

^aAlelo de referência

^bAlelo variante

Tabela 4 - Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo do gene *IL-10* (rs1800871) em pacientes coinfectados leishmaniose visceral/HIV e mono infectados HIV.

<i>IL-10</i> -819 A>G (rs1800871)	LV/HIV (n=98)	HIV (n=195)	Modelo genético	<i>p</i>	OR	IC (95%)
Genótipos						
AA	23(23)	27(14)	(AA vs. AG)	0,059	1,895	0,986 -3,607
AG	40(41)	89(45)	(AG vs. GG)	0,958	1,014	0,590-1,759
GG	35(36)	79(41)	(GG vs. AA)	0,059	1,923	0,975-3,770
AA+AG	63(64)	116(59)	(GG vs. AA+AG)	0,426	0,8158	0,489-1,364
GG+AG	75(76)	168(86)	(AA vs. GG+AG)	0,038	1,840	0,996-3,312
Alelos						
A ^a	86(44)	143(37)	-	-	-	-
G ^b	110(56)	247(63)	(A vs. G)	0,09	1,350	0,949-1,913

Teste Qui-quadrado calculado através do *software GraphPad Prism v.8.0.*

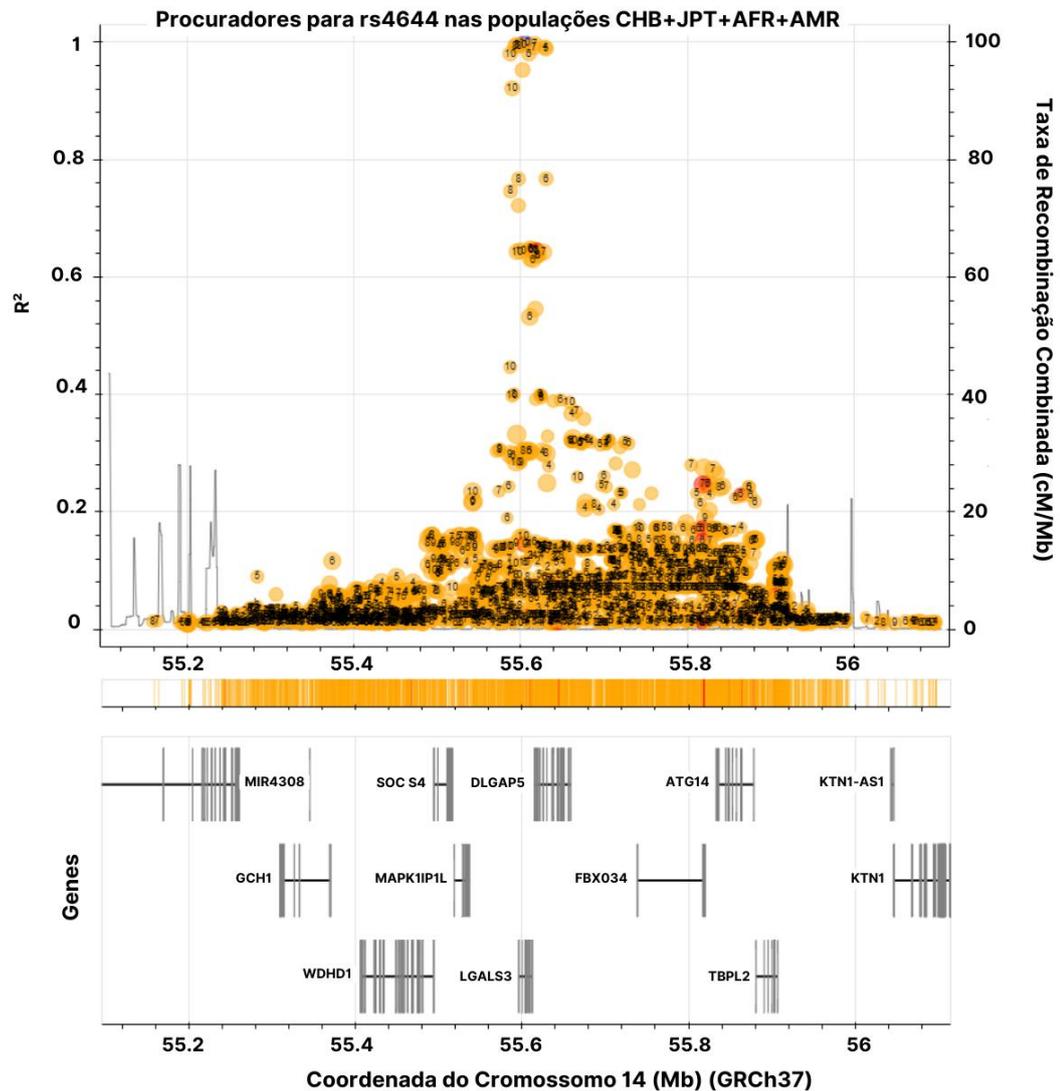
^aAlelo de referência

^bAlelo variante

8.3 Desequilíbrio de ligação

Doze SNPs próximos a rs4644 em desequilíbrio de ligação ($r^2 > 0,8$) foram verificados nas populações CHB+JPT+AFR+AMR, sendo os SNPs rs67098772, rs2147972, rs2075603, rs57970196, rs202132153 referentes ao gene *LGALS3* e os SNPs rs72718804, rs66871576, rs11621351, rs17832359 referentes ao gene *DLGAP5* e três não anotados (rs67805055, rs3825613, rs67756714) (Figura 11).

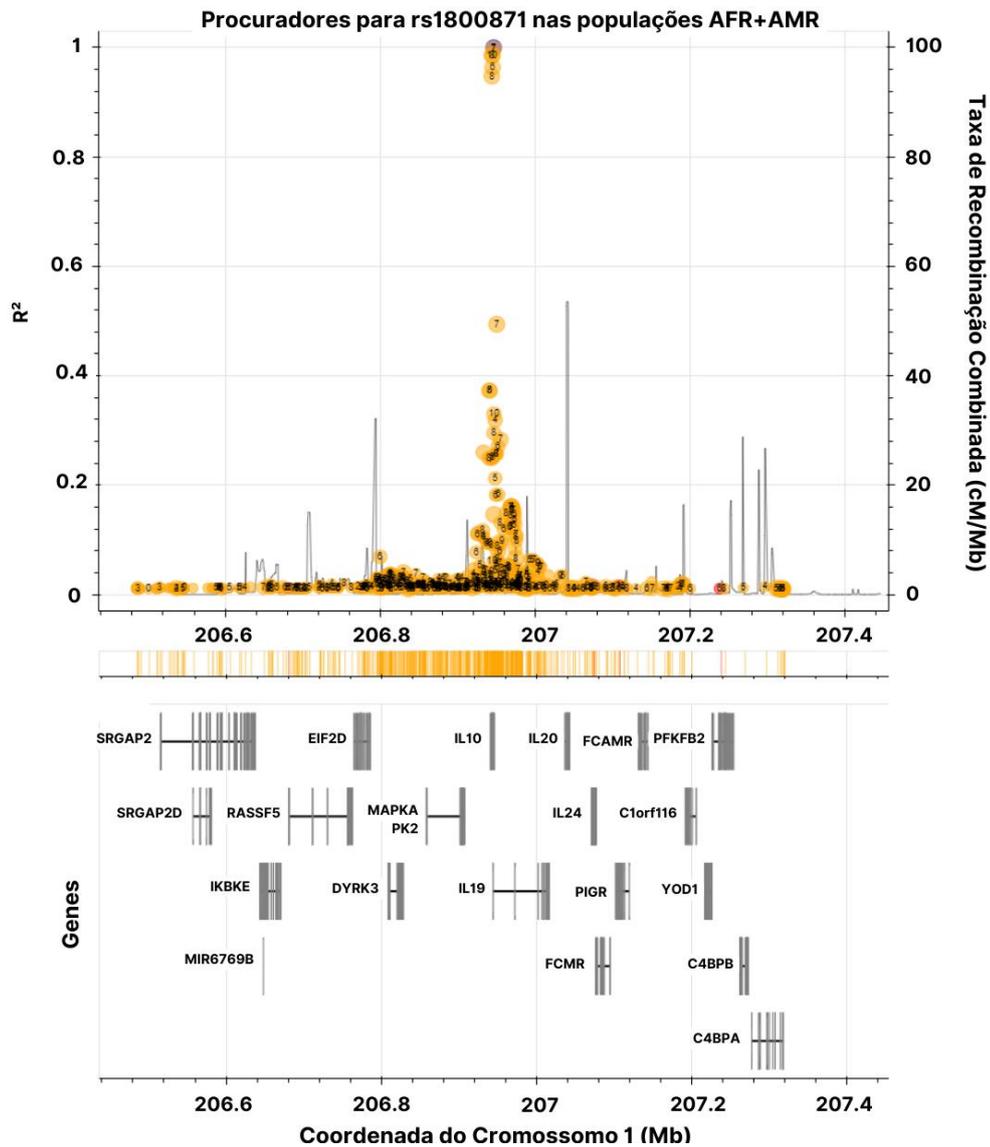
Figura 11 - Análise do desequilíbrio de ligação (LD) do rs4644 do gene *LGALS3*.



O gráfico apresenta doze SNPs em desequilíbrio de ligação (LD) com rs4644 (A/C) representados por círculos amarelos sobrepostos acima de $r^2=0,8$, e taxa de recombinação de 80 cM/Mb, sendo todos os SNPs localizados no cromossomo 14. Fonte: <https://ldlink.nci.nih.gov/?tab=ldproxy> (Adaptado pela autora). Acesso: 05 jan. 2023.

Cinco SNPs próximos a rs1800871 (rs1800872, rs1518111, rs1518110, rs3024490, rs1554286) em desequilíbrio de ligação ($r^2>0,8$) foram verificados nas populações AFR+AMR (Figura 12). Essas variantes são do gene *IL-10*.

Figura 12 - Análise do desequilíbrio de ligação (LD) do rs1800871 do gene *IL-10*.

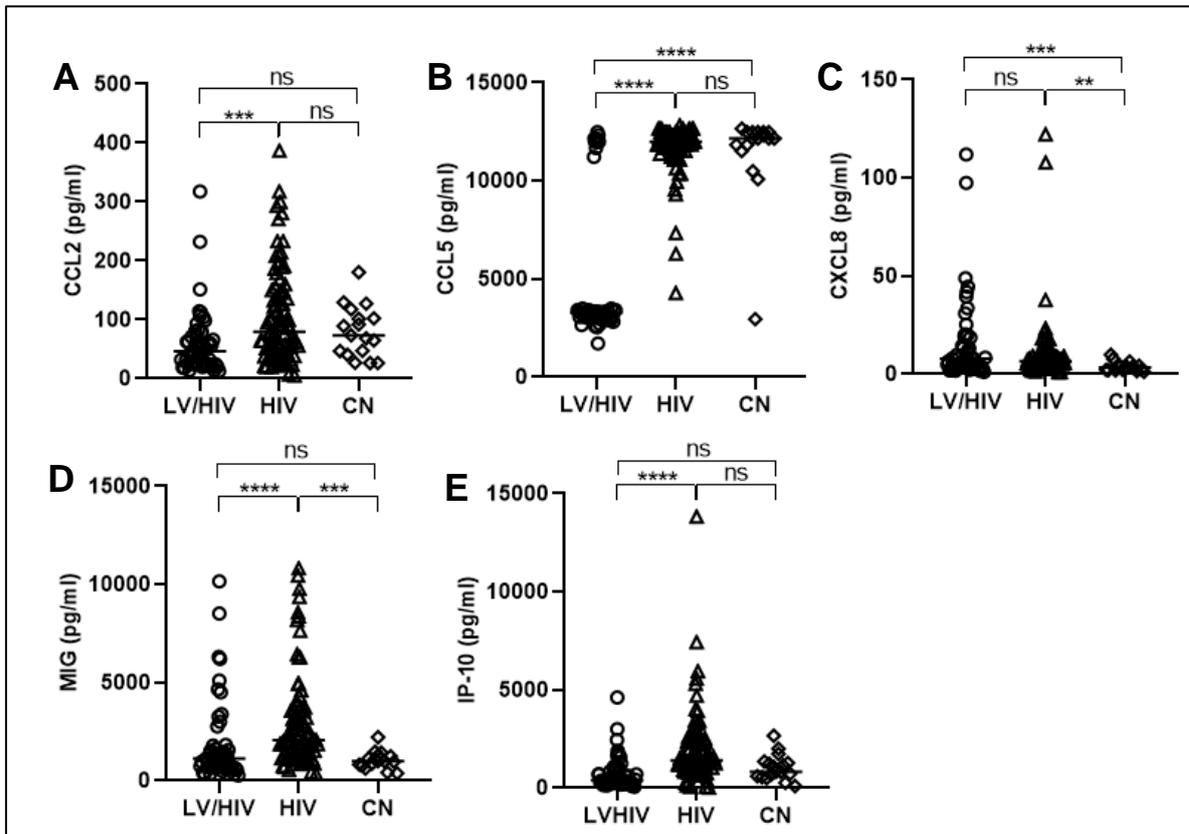


O gráfico apresenta cinco SNPs em desequilíbrio de ligação (LD) com rs1800871 (A/G) representados por círculos amarelos sobrepostos acima de $r^2=0,8$, e taxa de recombinação de 80 cM/Mb, sendo todos os SNPs localizados no cromossomo 1. Fonte: <https://ldlink.nci.nih.gov/?tab=ldproxy> (Adaptado pela autora). Acesso: 05 jan. 2023.

8.4 Determinação dos níveis séricos de quimiocinas

Diferenças significativas nos níveis de CCL2, CCL5, MIG e IP-10 foram observadas entre os grupos LV/HIV e HIV ($p<0,0001$) (Figura 13 A, B, D, E), os quais apresentaram-se mais elevados nos pacientes com HIV (Tabela 5). Quando comparado os grupos LV/HIV vs. CN, os níveis das quimiocinas CCL5 e CXCL8 diferiram significativamente ($p<0,05$) (Figura 13 B, C). Assim como, para CXCL8 e MIG em relação aos grupos HIV vs. CN (Figura 13 C, D).

Figura 13 - Comparações entre os níveis séricos de quimiocinas entre os grupos de comparações.



LV/HIV, pacientes assintomáticos coinfetados leishmaniose visceral/HIV (n=53); HIV, pacientes monoinfetados HIV (n=90); CN, controles negativos (17); ns, não significativo, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$.

Teste *Kruskal – Walls e Dunn's*; mediana e intervalo interquartil, calculado pelo software *GraphPad Prism v.8.0*.

Tabela 5 - Níveis séricos das quimiocinas em pacientes assintomáticos coinfetados leishmaniose visceral/HIV, monoinfetados HIV e controles negativos (CN).

Analito	LV/HIV (n=53)	HIV (n=90)	CN (n=17)
CCL2 (pg/ml)	46,28 (12,67-317,6)	79,92 (5,13-386,9)	73,35 (26,44-180,8)
CCL5 (pg/ml)	3.275 (1.713-12482)	11.989 (4.276-2.822)	12.151 (2.962-2.651)
CXCL8 (pg/ml)	7,890 (1,140-112)	6,590 (0,9300-122,2)	3,480 (1,130-9,960)
MIG (pg/ml)	1.131 (267-10.155)	2.066 (341,6-10.822)	999,8 (386,3-2.223)
IP-10 (pg/ml)	396,1 (67,42-4617)	1.409 (18,3-13.832)	836,7 (108,8-2.666)

Dados apresentados como mediana com percentis 25 e 75 entre parênteses.

8.5 Correlações entre os níveis de quimiocinas e dados laboratoriais

As correlações entre os níveis das quimiocinas e parâmetros laboratoriais entre coinfetados LV/HIV e monoinfetados HIV são mostrados nas Tabelas 6 e 7,

respectivamente. Os níveis de CXCL8 correlacionou-se negativamente com a carga viral ($r=-0,34$) nos coinfectados, e positivamente com a contagem de leucócitos ($r=0,25$) e neutrófilos ($r=0,36$) nos monoinfectados HIV. Além disso, para o grupo HIV, foram verificadas correlações positivas entre a CCL2 e contagens de leucócitos ($r=0,23$) e neutrófilos ($r=0,54$), e negativa entre MIG e contagens de linfócitos T CD4+ ($r=-0,21$).

Tabela 6 - Correlações entre as quimiocinas séricas e parâmetros hematológicos e bioquímicos no grupo assintomático coinfectado leishmaniose visceral/HIV.

LV/HIV	MIG	IP-10	CCL2	CCL5	CXCL8
Carga viral (cópias/MI)	0,21	0,07	-0,05	-0,04	-0,34 ^a
Linfócitos T CD4+ (células/mm³)	-0,20	-0,18	0,18	0,04	0,15
Linfócitos T CD8+ (células/mm³)	0,08	0,05	0,03	0,23	-0,03
Leucócitos (células/mm³)	-0,19	0,04	0,23	0,26	-0,09
Neutrófilos (células/mm³)	-0,32	-0,05	0,25	0,04	0,06
Linfócitos (células/mm³)	-0,39	-0,19	0,16	0,08	-0,22
Hemoglobina (g/DI)	-0,23	-0,17	-0,08	-0,05	-0,22
Plaquetas	-0,18	-0,11	0,03	0,01	0,07

Todos os valores representam o ρ de Spearman.

^a $p < 0,05$

Tabela 7 - Correlações entre as quimiocinas séricas e parâmetros hematológicos e bioquímicos no grupo monoinfectado HIV.

HIV	MIG	IP-10	CCL2	CCL5	CXCL8
Carga viral (cópias/MI)	0,12	0,01	-0,10	-0,09	-0,09
Linfócitos T CD4+ (células/mm³)	-0,21 ^a	-0,16	0,16	-0,17	-0,06
Linfócitos T CD8+ (células/mm³)	-0,85	-0,03	0,11	-0,20	0,01
Leucócitos (células/mm³)	-0,05	0,02	0,23 ^a	-0,00	0,25 ^a
Neutrófilos (células/mm³)	0,15	0,06	0,54 ^b	0,10	0,36 ^a
Linfócitos (células/mm³)	-0,20	-0,12	0,17	0,02	-0,13
Hemoglobina (g/DI)	-0,14	-0,03	0,13	0,13	-0,08
Plaquetas	-0,08	-0,12	-0,09	0,00	-0,06

Todos os valores representam o ρ de Spearman.

^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,0005$.

Além disso, em pacientes assintomáticos coinfectados LV/HIV, foram observadas correlações estatisticamente positivas entre CXCL8 e CCL2 ($r=0,40$); MIG e CCL2 ($r=0,27$); IP-10 e CCL2 ($r=0,30$); MIG e CCL5 ($r=0,31$) e IP-10 e MIG ($r=0,58$) (Tabela 8). No grupo HIV, correlações estatisticamente positivas foram observadas entre MIG e CXCL8 ($r=0,46$); MIG e IP-10 ($r=0,75$) e IP-10 e CXCL8 ($r=0,29$) (Tabela 9).

Tabela 8 - Correlações entre as quimiocinas séricas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10 no grupo assintomático coinfectado leishmaniose visceral/HIV.

LV/HIV	CCL2	CCL5	CXCL8	MIG	IP-10
CCL2	-	-	-	-	-
CCL5	0,13	-	-	-	-
CXCL8	0,40 ^b	0,18	-	-	-
MIG	0,27 ^a	0,3 ^a	0,19	-	-
IP-10	0,30 ^a	0,26	0,18	0,58 ^b	-

Todos os valores representam o ρ de Spearman.

^a $p < 0,05$

^b $p < 0,005$.

Tabela 9 - Correlações entre as quimiocinas séricas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10 no grupo mono infectado HIV.

HIV	CCL2	CCL5	CXCL8	MIG	IP-10
CCL2	-	-	-	-	-
CCL5	0,09	-	-	-	-
CXCL8	0,19	-0,01	-	-	-
MIG	0,74	0,13	0,46 ^a	-	-
IP-10	0,01	0,15	0,29 ^b	0,75 ^b	-

Todos os valores representam o ρ de Spearman.

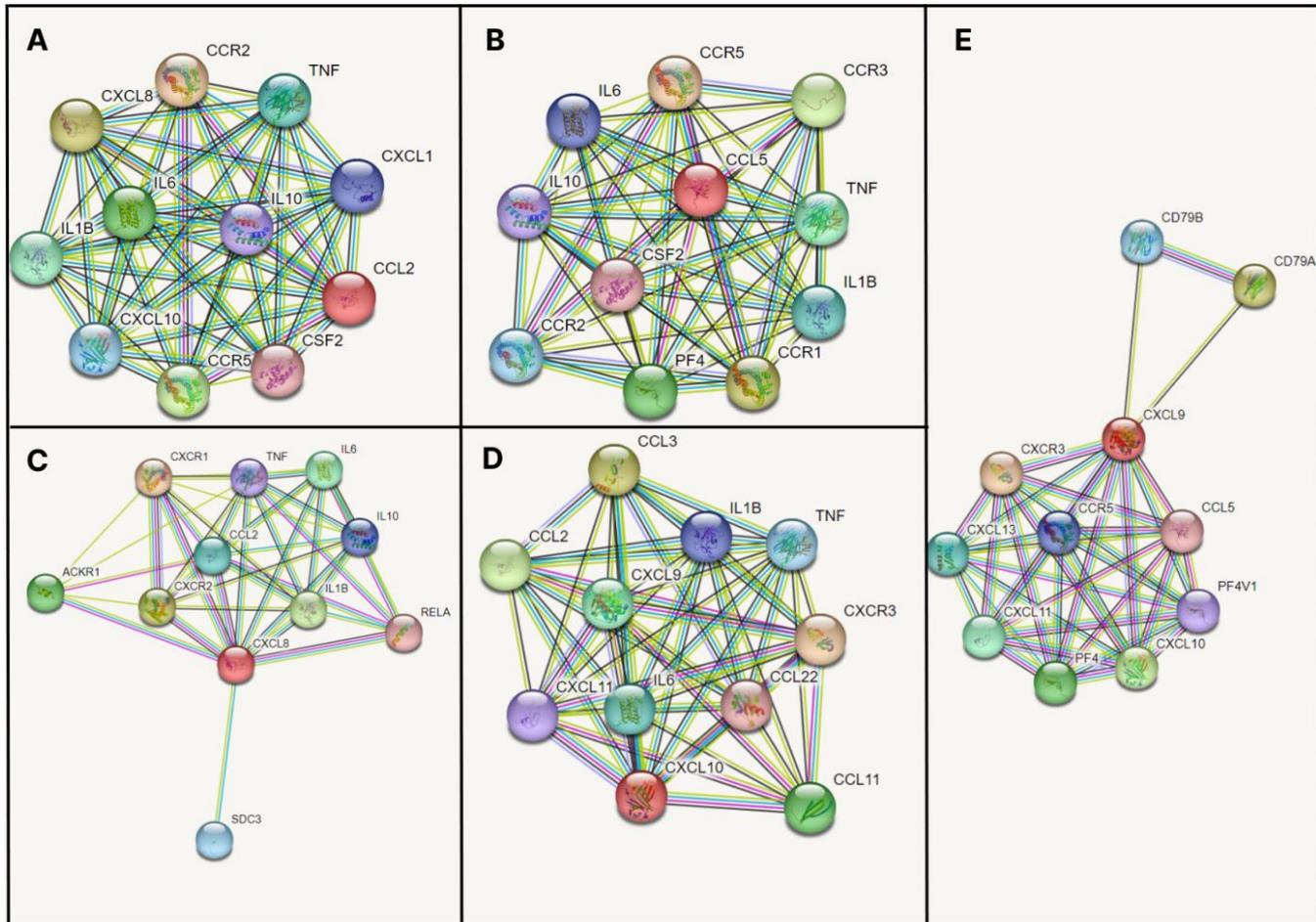
^a $p < 0,005$

^b $p < 0,0005$.

8.6 Análise das interações proteicas de CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10

Para avaliar possíveis interações entre as quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10, foi gerada uma rede PPI (Interação Proteína-Proteína) por meio do STRING (Figura 14), em que foi encontrada associação entre elas e demais proteínas. Por sua vez, a análise de caminhos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) indicou a associação das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8 e CXCL10 com a leishmaniose (hsa05140). Adicionalmente, CXCL8 foi associado à sinalização purinérgica na infecção por leishmaniose (hsa9660826) e a CCL5 à infecção por *Leishmania* (hsa9658195) pelo Reactoma.

Figura 14- Rede de interação das proteínas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10.



Rede de interação proteica da CCL2 (A), CCL5 (B), CXCL8 (C), IP-10 (D) e (E) MIG.
 Fonte: STRING (<https://string-db.org/cgi/>). Acesso: 10 jan. 2023.

9 DISCUSSÃO

Este estudo confirmou a associação entre o polimorfismo *IL-10* (rs1800871) e a LV em pacientes com HIV, sendo o alelo A responsável por conferir suscetibilidade à doença. Além disso, verificamos níveis significativamente elevados das quimiocinas pró-inflamatórias CCL2, CCL5, MIG e IP-10 entre indivíduos mono infectados HIV e associação negativa entre CXCL8 e carga viral no grupo de coinfeção LV/HIV.

Os achados epidemiológicos evidenciam maior possibilidade de ocorrência do HIV e LV em populações com baixo acesso a educação e uma menor renda. Aspectos socioeconômicos como estes, também foram associados a incidência do HIV no estudo de Torres *et al.* (2021) e para LV no estudo de Luz *et al.* (2021) desenvolvidos no Brasil.

Estudos anteriores relataram a influência do gene da Gal-3 (*LGALS3*) na interação entre patógeno e hospedeiro, envolvendo a imunidade inata e adaptativa (BHAUMIK *et al.*, 2013; FERMINO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2017). Em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi knockout* para *LGALS3*, foi observado o aumento da parasitemia e redução do recrutamento de leucócitos devido à diminuição de citocinas pró-inflamatórias (SILVA *et al.*, 2017). Na infecção por *L. (L) donovani*, a Gal-3 foi correlacionada positivamente com a frequência de células mononucleares, com as citocinas IFN- γ e IL-10 e com o aumento dos níveis de expressão de sítios de ligação da Gal-3 em locais infectados, quando comparado com controles saudáveis (DATTA *et al.*, 2019).

A presença de polimorfismos neste gene podem influenciar negativamente ou positivamente a infecção alterando a expressão ou atividade da proteína (KALANI; CHOOPANIZADEH; RASOULI, 2019). Selecionamos o rs4644 (*LGALS3*), que corresponde a uma mutação missense, caracterizada pela mudança da citosina (C) pela adenina (A), e, conseqüentemente, a alteração da prolina pela histidina na proteína resultante. O alelo variante A (Hist) está associado com a alteração da disponibilidade da proteína, sendo preferencialmente clivada pelas metaloproteinases MMP2 e MMP9. Segundo Furuya *et al.* (2018), por meio de análises *in silico* pelos softwares *Polyphen-2* e *SIFT*, essa substituição demonstrou ser potencialmente deletéria para a função de proteína. Não há estudos envolvendo esse polimorfismo na LV e nem em casos de coinfeção LV/HIV. Aqui, verificamos

que não houve associação significativa com os grupos avaliados. As frequências alélicas (C e A) encontradas (Tabela 2) foram semelhantes ao observado em outro estudo (71% e 29%) desenvolvido no Brasil, que verificou a associação do genótipo AA a níveis reduzidos de Gal-3 e a suscetibilidade ao desenvolvimento de infecção em trato respiratório em crianças com anemia falciforme (BELMONT *et al.*, 2016). Esse SNP também esteve associado à progressão de câncer gástrico (FURUYA *et al.*, 2018) e a artrite reumatóide (XU *et al.*, 2021). Em contrapartida, em um estudo envolvendo a Doença de Chagas, também não foram observadas associações entre o polimorfismo e o desenvolvimento da doença (CRUZ *et al.*, 2015), demonstrando resultados semelhantes quando avaliado infecções por tripanossomatídeos.

Quando analisado o genoma, sabe-se que um conjunto de variantes em desequilíbrio de ligação (LD) podem influenciar a expressão do gene relacionado (FARH *et al.*, 2014). Nesse aspecto, a presença de doze SNPs em desequilíbrio de ligação com rs4644, sobretudo aqueles localizados no mesmo gene (*LGALS3*), podem estar associados à suscetibilidade à coinfeção LV/HIV. Assim, o papel desses SNPs, em particular rs4644, necessita de investigações adicionais envolvendo um tamanho amostral maior.

Nossos resultados confirmaram a associação do modelo recessivo (AA vs GG+AG) do SNP -819 *IL-10* (rs1800871) com a coinfeção LV/HIV, sendo o alelo A responsável pela suscetibilidade. Destaca-se que a primeira evidência de que polimorfismos presentes neste gene poderiam estar associados a LV foi demonstrada por Hajilooi *et al.* (2013) em uma população do noroeste do Irã, o qual identificaram o genótipo heterozigoto do SNP -819 *IL-10* significativamente associado com a suscetibilidade à LV em pacientes sintomáticos, quando comparado com pacientes assintomáticos e indivíduos saudáveis ($p < 0,05$).

Segundo Salhi *et al.* (2008), esse genótipo estaria relacionado aos novos sítios de ligação de fatores de transcrição, estando associado à regulação positiva da *IL-10*. Deste modo, esse SNP possibilita o aumento dos níveis da citocina, que atua influenciando a supressão de respostas imunes e, conseqüentemente, favorecendo a suscetibilidade às doenças. Para Hajilooi *et al.* (2013), não está clara a relação deste genótipo com níveis de expressão elevados da *IL-10*; no entanto, é sugerido mecanismos epigenéticos que aumentam a eficiência do promotor em heterozigotos, favorecendo a expressão mais acentuada desta molécula.

Não há estudos que avaliem esse polimorfismo entre indivíduos com

coinfecção LV/HIV, em comparação aos mono infectados HIV, sendo este trabalho pioneiro na avaliação da associação de *IL-10* (rs1800871) nesta população. Ademais, a presença de outros SNPs do gene da *IL-10* próximos ao rs1800871, podem também estar associados à coinfecção LV/HIV. Desse modo, incentivamos a realização de estudos funcionais com a *IL-10* no intuito de melhor compreender o papel do SNP rs1800871 na expressão desta molécula e suscetibilidade à LV entre pacientes com coinfecção pelo HIV.

Além dos fatores genéticos envolvidos, a investigação dos níveis circulantes de moléculas imunológicas, podem indicar prováveis desfechos clínicos da doença (BARBOSA-JÚNIOR *et al.*, 2020b). Em um estudo realizado anteriormente, pacientes sintomáticos co infectados LV/HIV apresentaram aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias (*IL-10*) e redução das pró-inflamatórias (*IL-2* e *TNF*) em comparação aos mono infectados pelo HIV e indivíduos saudáveis ($p < 0,001$) (ABDULLAHI *et al.*, 2020). Esses achados podem sugerir que a mono infecção pelo HIV pode apresentar um perfil pró-inflamatório mais significativo que na coinfecção LV/HIV. Na presença de *Leishmania* spp., mecanismos supressores da resposta imune protetora são mais proeminentes, especialmente durante a infecção sintomática, devido ação sinérgica que ambos os patógenos promovem no hospedeiro, reforçando mutuamente sua replicação, e, conseqüentemente a gravidade da doença (ANDARGIE; EJARA, 2015; ABDULLAHI *et al.*, 2020). Essa visão pode ser corroborada a partir dos achados deste estudo, em que a análise comparativa das quimiocinas pró-inflamatórias *CCL2*, *CCL5*, *MIG* e *IP-10* entre os grupos LV/HIV e HIV demonstrou variações significativas entre eles, apresentando-se mais elevadas no grupo HIV. Por sua vez, os níveis verificados dessas quimiocinas no grupo LV/HIV podem sugerir um ambiente inflamatório associado a uma resposta imune bem estabelecida, visto que a população envolveu indivíduos assintomáticos e em uso de HAART, apresentando em sua maioria carga viral indetectável (< 50 cópias/mL).

Verificamos que os níveis de *CCL2* não foram associados à coinfecção LV/HIV, quando comparada com o grupo HIV e controles negativos, ao passo que a *CCL2* revelou associação positiva com a contagem de leucócitos e neutrófilos e maiores níveis no grupo HIV. Por outro lado, no estudo de Ibarra-Meneses *et al.* (2017b), os níveis de *CCL2* estavam associados significativamente a LV quando comparado com controle negativo, sendo apontada como um importante

biomarcador de infecção assintomática e de cura. Neste estudo, sugerimos prováveis mecanismos associados à coinfeção LV/HIV que afetem os níveis dessa molécula e conseqüentemente a sua participação no desenvolvimento de uma resposta imune protetora.

No estudo de Sisay *et al.* (2014), foi verificada associação negativa entre a CCL5 e a carga viral e maiores níveis dessa quimiocina em indivíduos com HIV quando comparado aos controles saudáveis, sugerindo o envolvimento desta molécula na regulação do HIV. Entretanto, em nosso estudo, não houve diferenças significativas entre os indivíduos HIV e controles negativos. Além disso, os níveis significativamente elevados de CCL5 entre os controles negativos quando comparado com indivíduos coinfectados LV/HIV podem sugerir um quadro inflamatório influenciado por fatores desconhecidos no momento da coleta nesses indivíduos.

Nesse estudo, verificamos associação negativa entre CXCL8 e carga viral no grupo LV/HIV, não sendo observada essa associação no grupo HIV, sugerindo que a LV pode modular a produção dessa quimiocina em caso de coinfeção com HIV. A associação da CXCL8 com a LV também foi apontada em outros estudos, como o de Ibarra Menezes *et al.* (2017c) em que a quimiocina foi sugerida como importante biomarcador de infecção assintomática. Por outro lado, diferenças significativas em relação aos níveis de CXCL8 entre o grupo HIV e controle negativo verificado em nosso estudo, assim como, associação positiva de CXCL8 com a contagem de leucócitos e neutrófilos no grupo HIV podem sugerir mecanismos de modulação da quimiocina envolvendo a infecção pelo HIV.

Ao contrário de nossos achados para MIG e IP-10, Botana *et al.* (2019) verificaram níveis significativamente aumentados dessas quimiocinas em amostras de plasma e células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimuladas com SLA de indivíduos assintomáticos LV/HIV, quando comparado aos controles monoinfectados HIV em área endêmica para *L. infantum* (Fuenlabrada, Espanha). Essa diferença pode ser atribuída ao tipo de amostra utilizada e à dosagem após estimulação de amostras com SLA, além de fatores inerentes aos hospedeiros, como os aspectos genéticos e imunológicos que podem variar entre diferentes áreas do globo.

Correlações positivas entre as quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, MIG e IP-10 e associação das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8 e CXCL10 com a leishmaniose

(hsa05140) verificados por meio da plataforma STRING, podem indicar ações sinérgicas entre elas ao participarem conjuntamente de processos mecanismos inflamatórios associados ao controle da infecção. Segundo Barbosa Júnior *et al.* (2020b), a ação sinérgica entre citocinas na coinfeção LV/HIV pode ser facilitada pela relação mútua que ocorre entre *Leishmania spp.* e o HIV no hospedeiro.

10 CONCLUSÃO

- Resultados da análise epidemiológica e laboratorial foram pareados, sem distinção entre os grupos LV/HIV e HIV;
- Menor renda e tempo de estudo foram verificados nos grupos LV/HIV e HIV, o qual indica uma maior incidência de infecção pelo HIV e LV em populações socioeconomicamente mais desfavorecidas;
- Não foi possível observar diferença estatística entre os grupos LV/HIV e HIV para o SNP *LGALS3* rs4644;
- Sugerimos o SNP *IL-10* rs1800871 como biomarcador da coinfeção LV/HIV;
- Níveis significativamente elevados das quimiocinas CCL2, CCL5, MIG e IP-10 entre os pacientes mono infectados pelo HIV sugerem ambiente pró-inflamatório mais significativo nesta condição;
- Correlações positivas entre as quimiocinas no grupo coinfestado LV/HIV e o compartilhamento de redes de interação podem sugerir ações sinérgicas entre elas na coinfeção;
- A associação negativa entre a CXCL8 e a carga viral na coinfeção LV/HIV sugere possíveis interações entre a *Leishmania* spp. e o HIV com efeitos importantes na resposta imune do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- ABASS, E. *et al.* rKLO8, a novel *Leishmania donovani*-derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. **PLoS neglected tropical diseases**, California, v.7, n.7, p.e2322, July, 2013.
- ABDULLAHI, I. N. *et al.* Leucocytes and Th-associated Cytokine Profile of HIV-Leishmaniasis Co-Infected Persons Attending Abuja Teaching Hospital, Nigeria. **The Eurasian Journal of Medicine**, Erzurum, v.52, n.3, p.271, Oct. 2020.
- ABONGOMERA, C. *et al.* The initial effectiveness of liposomal amphotericin B (AmBisome) and miltefosine combination for treatment of visceral Leishmaniasis in HIV co-infected patients in Ethiopia: A retrospective cohort study. **PLoS neglected tropical diseases**, California, v.12, n.5, p.e0006527, May, 2018.
- ADEM, E. *et al.* Successful treatment of human visceral Leishmaniasis restores antigen-specific IFN- γ , but not IL-10 production. **PLoS neglected tropical diseases**, California, v.10, n.3, p.e0004468, Mar. 2016.
- ADRIAENSEN, W. *et al.* Immunomodulatory therapy of visceral Leishmaniasis in human immunodeficiency virus-coinfected patients. **Frontiers in immunology**, v.8, p.1943, Jan. 2018a.
- ADRIAENSEN, W. *et al.* Serum levels of soluble CD40 ligand and neopterin in HIV coinfecting asymptomatic and symptomatic visceral Leishmaniasis patients. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p.428, Dec. 2018b.
- AFZAL, M. S. *et al.* Analysis of interleukin-10 gene polymorphisms and hepatitis C susceptibility in Pakistan. **The Journal of Infection in Developing Countries**, Sássari, v.5, n.6, p.473-479, Jul. 2011.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: a review on parasite, vector and reservoir host. **Health Science Journal**, London, v.11, n.4, p.1, Aug. 2017.
- ALVAR, J. *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical microbiology reviews**, v.21, n.2, p.334-359, Apr. 2008.
- ANDARGIE, T. E.; EJARA, E. D. Pro-and anti-inflammatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Journal of Cell Science & Therapy**, v.6, n.2, p.1, Apr. 2015.
- ARAÚJO, F. F. *et al.* Chemokines in Leishmaniasis: Map of cell movements highlights the landscape of infection and pathogenesis. **Cytokine**, Baltimore, v.147, p.155339, Nov. 2021.
- ARCHER, N. S. *et al.* Genetic variants of *SLC11A1* are associated with both autoimmune and infectious diseases: systematic review and meta-analysis. **Genes & Immunity**, v.16, n.4, p.275-283, Apr. 2015.
- AVELAR, D. M.; CARVALHO, D. M.; RABELLO, A. Development and clinical evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the

diagnosis of human visceral Leishmaniasis in Brazil. **BioMed research international**, United States, v.2019, July, 2019.

AVILA-GARCÍA, M. *et al.* Transmission to humans. Leishmaniasis. **Trends in epidemiology, diagnosis and treatment**, p.27-44, Sept. 2014.

BARBOSA-JÚNIOR, W. L. *et al.* *SLC11A1* (rs3731865) polymorphism and susceptibility to visceral Leishmaniasis in HIV-coinfected patients from Northeastern Brazil. **Parasitology Research**, v.119, n.2, p.491-499, Feb. 2020a.

BARBOSA-JÚNIOR, W. L. *et al.* Higher levels of TNF and IL-4 cytokines and low miR-182 expression in visceral Leishmaniasis-HIV co-infected patients. **Parasite Immunology**, v.42, n.4, p.12701, Apr. 2020b.

BARBOSA-JÚNIOR, W. L. *et al.* Rapid tests and the diagnosis of visceral Leishmaniasis and human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome coinfection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Arlington, v.93, n.5, p.967, 2015.

BARRETO-DE-SOUZA, V. *et al.* Increased *Leishmania* replication in HIV-1–infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. **The Journal of infectious diseases**, Oxford, v.194, n.6, p.846-854, Sep. 2006.

BECTON, DICKINSON AND COMPANY BD BIOSCIENCES. BD™ **Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit**: Instruction Manual. San Jose: BD, c2014. Disponível em: https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/CBA_HumanChemokine_Kit_Manual.pdf. Acesso em: 17 fev. 2022.

BELMONT, T. F. M. *et al.* Single Nucleotide Polymorphisms at+ 191 and+ 292 of Galectin-3 Gene (LGALS3) Related to Lower GAL-3 Serum Levels Are Associated with Frequent Respiratory Tract Infection and Vaso-Occlusive Crisis in Children with Sickle Cell Anemia. **PloS one**, v.11, n.9, p.0162297, 2016.

BEZERRA, G. S. N. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification methods for diagnosis of visceral Leishmaniasis (kala-azar)—a systematic review. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v.20, n.5, p.455-465, Mar, 2020.

BHAUMIK, P. *et al.* Galectin-3 facilitates neutrophil recruitment as an innate immune response to a parasitic protozoa cutaneous infection. **The Journal of Immunology**, Rockville, v.190, n.2, p.630-640, Jan. 2013.

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clin Pharmacol Ther**, v.69, n.3, p.89-95, 2001.

BLACKWELL, J. M.; FAKIOLA, M.; SINGH, O. P. Genetics, Transcriptomics and Meta-Taxonomics in Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p.702, Nov. 2020.

BOELAERT, M. *et al.* Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral Leishmaniasis. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v.5, n.11, p.S31-S39, Nov. 2007.

BONFIM, N. E. S. M. T.; SCOTT, A. L. B.; CALDERON, L. A. Leishmaniasis: Molecular Aspects of Parasite Dimorphic Forms Life Cycle. **Leishmaniasis: General Aspects of a Stigmatized Disease**, Londres, p.3, Feb. 2022.

BOSSOLASCO, S. *et al.* Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral Leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v.41, n.11, p.5080-5084, Nov. 2003.

BOTANA, L. *et al.* Asymptomatic immune responders to *Leishmania* among HIV positive patients. **PLoS neglected tropical diseases**, Califórnia, v.13, n.6, p.e0007461, Jun. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/leishmaniose/manual-de-recomendacoes-para-diagnostico-tratamento-e-acompanhamento-de-pacientes-com-a-coinfeccao-leishmania-hiv.pdf/view>. Acesso em: 28 jan. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual Técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV em Pernambuco em Adultos e Crianças. Brasília, DF, 2018. Disponível em: https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/2018/manual_tecnico_hiv_27_11_2018_web.pdf/view. Acesso em: 28 jan. 2023.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/atualizacao-21-10-2022/lv-casos.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2023.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmanios_e_visceral_1edicao.pdf. Acesso em: 28 jan. 2023.

BUARQUE, S. *et al.* Prevalência de Leishmaniose Visceral em Pernambuco: Estudo retrospectivo de 11 anos Prevalence of visceral leishmanioses in Pernambuco: Retrospective study of 11 years. **Brazilian Journal of Health Review**, Paraná, v.4, n.6, p. 28537-28550, Dec. 2021.

BURZA, S. *et al.* Leishmaniasis. **The Lancet**, [s. l.], v.392, n.10151, p.951–970, Aug. 2018.

BURZA, S. *et al.* Visceral Leishmaniasis and HIV co-infection in Bihar, India: long-

term effectiveness and treatment outcomes with liposomal amphotericin B (AmBisome). **PLoS neglected tropical diseases**, Califórnia, v.8, n.8, p.e3053, Aug. 2014.

CASADO, J. L. *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 Medicine**, [s. l.], v.16, n.4, p.240–248, Jan. 2015.

CASTELLI, G. *et al.* Molecular diagnosis of Leishmaniasis: quantification of parasite load by a real-time-PCR assay with high sensitivity. **Pathogens**, v.10, n.7, p.865, Jul. 2021.

CASTILLO-CASTAÑEDA, A. *et al.* Spatial and temporal variability of visceral Leishmaniasis in Colombia, 2007 to 2018. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v.105, n.1, p.144-155, Jul. 2021.

CAVALCANTI, A. T. A. *et al.* Diagnosing visceral Leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection: a case series study in Pernambuco, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.54, n.1, p.43-47, Jan-Feb. 2012.

CECCARELLI, M. *et al.* Unusual signs and symptoms in HIV-positive patients coinfecting with *Leishmania* spp: the importance of neglected tropical disease in differential diagnosis. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, Skopje, v.6, n.5, p.843, May, 2018.

CIPRIANO, P. *et al.* Visceral Leishmaniasis in HIV-infected patients: the challenge of relapse and treatment failure. **Acta Médica Portuguesa**, v.30, n.6, p.443-448, Jun. 2017.

CLARKE, G. M. *et al.* Basic statistical analysis in genetic case-control studies. **Nature protocols**, Londres, v.6, n. 2, p.121-133, fev. 2011.

CLOOTS, K. *et al.* Male predominance in reported Visceral Leishmaniasis cases: Nature or nurture? A comparison of population-based with health facility-reported data. **PLoS neglected tropical diseases**, Califórnia, v.14, n.1, p.e0007995, Jan. 2020.

COSTA SANTIAGO, H. *et al.* Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. **Infection and immunity**, Califórnia, v.72, n.8, p.4918-4923, Aug. 2004.

COTA, G. F. *et al.* *Leishmania*-HIV coinfection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, Califórnia, v.8, n.4, p.e2816, Apr. 2014.

COTA, G. F. *et al.* Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral Leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Arlington, v.89, n.3, p.570, Sep. 2013.

COTA, G. F. *et al.* The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral Leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, Califórnia, v.6, n.5, p.e1665, May. 2012.

COTA, G. F.; SOUSA, M. R.; RABELLO, A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v.5, n.6, p.e1153, Jun. 2011.

COUTINHO, J. *et al.* Visceral Leishmaniasis and Leishmaniasis-HIV coinfection: comparative study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.50, n.5, p.670–674, Sep-Oct. 2017.

CRUZ, G. S. *et al.* Assessment of Galectin-3 polymorphism in subjects with chronic chagas disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.105, p.472-478, Nov. 2015.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênica para o homem, *Leishmania chagasi* n.sp. **Hospital**, v.11, p.148-152, 1937.

DATTA, S. *et al.* Dermatological implications of galectin-3 in circulation: an assessment from the perspective of patients with differential manifestations of post-Kala-azar dermal Leishmaniasis. **The American Journal of Dermatopathology**, v.41, n.12, p.897-907, Dez. 2019.

DEY, R. *et al.* Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. **Scandinavian journal of immunology**, v.66, n.6, p.671-683, Dec. 2007.

DINIZ, L. F. B.; SOUZA, C. D. F. D.; CARMO, R. F. D. Epidemiology of human visceral Leishmaniasis in the urban centers of the lower-middle São Francisco Valley, Brazilian semiarid region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.51, n.4, p.461-6, Jul-Aug. 2018.

DIRO, E. *et al.* Atypical manifestations of visceral Leishmaniasis in patients with HIV in north Ethiopia: a gap in guidelines for the management of opportunistic infections in resourcepoor settings. **Lancet Infect Dis**. v.15, n.1, p.122–129, Jan. 2015.

DIRO, E. *et al.* Long-term clinical outcomes in visceral Leishmaniasis/human immunodeficiency virus–coinfected patients during and after pentamidine secondary prophylaxis in ethiopia: a single-arm clinical trial. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v.66, n.3, p.444-451, Jan. 2018.

EL-SAFI, S. H. *et al.* Field evaluation of latex agglutination test for detecting urinary antigens in visceral Leishmaniasis in Sudan. **EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal**, v.9, n.4, p.844-855, Feb. 2003.

EZRA, N.; OCHOA, M. T.; CRAFT, N. Human immunodeficiency virus and Leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, v.2, n.3, p.248, Sep-Dec.

2010.

FARH, K. K. *et al.* Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. **Nature**, Londres, v.518, n.7539, p.337-343, out. 2014.

FARINA, J. M. *et al.* Leishmaniasis & Heart. In: Neglected Tropical Diseases and other Infectious Diseases affecting the Heart. **Academic Press**, p.73-81, Feb. 2022.

FERMINO, M. L. *et al.* Galectin-3 negatively regulates the frequency and function of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells and influences the course of *Leishmania major* infection. **European journal of immunology**, v.43, n.7, p.1806-1817, Jul. 2013.

FERNÁNDEZ-COTRINA, J. *et al.* Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniasis by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.192, n.1-3, p. 118-128, Feb. 2013.

FERREIRA, G. R. *et al.* Biomarkers of disease severity in patients with visceral Leishmaniasis co-infected with HIV. **Cytokine**, Baltimore, v.149, p.155747, Jan. 2022.

FERROGLIO, E. *et al.* Epidemiological evaluation of *Leishmania infantum* zoonotic transmission risk in the recently established endemic area of Northwestern Italy. **Zoonoses and public health**, v.65, n.6, p.675-682, Sep. 2018.

FRANCO, L. H. *et al.* Innate immune activation and subversion of mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. **Journal of parasitology research**, v.2012, Feb. 2012.

FREIRE, M. L. *et al.* Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral Leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, Califórnia, v.13, n.7, p.e0007484, Jul. 2019.

FREIRE, M. L. *et al.* Cost-effectiveness of serological tests for human visceral leishmaniasis in the Brazilian scenario. **PLoS neglected tropical diseases**, Califórnia, v.14, n.10, p.e0008741, Oct. 2020.

FREIRE, M. L. *et al.* Evaluation of a new brand of immunochromatographic test for visceral leishmaniasis in Brazil made available from 2018. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 60, Jul. 2018.

FURUYA, T. K. *et al.* Association between polymorphisms in inflammatory response-related genes and the susceptibility, progression and prognosis of the diffuse histological subtype of gastric cancer. **Genes**, v.9, n.12, p.631, Dec. 2018.

GARCÍA-GARCÍA, J. A. *et al.* Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected patients. **Journal of clinical microbiology**, v.44, n.12, p.4455-4458, Oct. 2006.

GAUR, U. *et al.* An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine

cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, Rockville, v.179, n.12, p.8446-8453, Dec. 2007.

GHATEI, M. A. *et al.* Performance of latex agglutination test (KAtex) in diagnosis of visceral leishmaniasis in Iran. **Iranian Journal of Immunology**, Shiraz, v.6, n.4, p.202-207, Dec. 2009.

GIDWANI, K. *et al.* Interferon-gamma release assay (modified QuantiFERON) as a potential marker of infection for *Leishmania donovani*, a proof of concept study. **PLoS neglected tropical diseases**, California, v.5, n.4, p.e1042, Apr. 2011.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. C. *et al.* The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v.8, p.1437, Oct. 2017.

GONZALEZ, C. *et al.* Current Knowledge of *Leishmania* vectors in Mexico: how geographic distributions of species relate to transmission areas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v.85, n.5, p.839, Nov. 2011.

GUEDES, D. L. *et al.* Asymptomatic *Leishmania* infection in HIV-positive outpatients on antiretroviral therapy in Pernambuco, Brazil. **PloS Neglected Tropical Diseases**, California, v.15, n.1, p.e0009067, Jan. 2021.

GUEDES, D. L. *et al.* Sexual Transmission of Visceral Leishmaniasis: A Neglected Story. **Trends in Parasitology**, v.36, n.12, p.950-952, Dec. 2020.

GUEDES, D. L. *et al.* Visceral Leishmaniasis in Hospitalized HIV-Infected Patients in Pernambuco, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v.99, n.6, p.1541-1546, Dec. 2018.

HAGOS, D. G. *et al.* Utility of the Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis from Blood Samples in Ethiopia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v.105, n.4, p.1050, July, 2021.

HAILU, A. *et al.* Elevated plasma levels of interferon (IFN)- γ , IFN-inducing cytokines, and IFN-inducible CXC chemokines in visceral Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v.71, n.5, p.561-7, June, 2004.

HAJILOOI, M. *et al.* Is the *IL 10 -819* Polymorphism Associated with Visceral Leishmaniasis?. **Inflammation**, v.36, n.6, p.1513-1518, Aug. 2013.

HANAFI-BOJD, A. A. *et al.* Predicted distribution of visceral Leishmaniasis vectors (Diptera: Psychodidae; Phlebotominae) in Iran: a niche model study. **Zoonoses and public health**, v.62, n.8, p.644-654, Dec. 2015.

HARA, A. *et al.* Galectin-3 as a next-generation biomarker for detecting early stage of various diseases. **Biomolecules**, v.10, n.3, p.389, Mar. 2020.

IBARRA-MENESES, A. V. *et al.* IFN- γ , IL-2, IP-10, and MIG as biomarkers of

exposure to *Leishmania* spp., and of cure in human visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, p.200, May. 2017a.

IBARRA-MENESES, A. V. *et al.* Monocyte chemotactic protein 1 in plasma from soluble *Leishmania* antigen-stimulated whole blood as a potential biomarker of the cellular immune response to *Leishmania infantum*. **Frontiers in Immunology**, v.8, p.1208, Sep. 2017b.

IBARRA-MENESES, A. V. *et al.* Cytokines and chemokines measured in dried SLA-stimulated whole blood spots for asymptomatic *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* infection. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p.17266, Dec. 2017c.

IBARRA-MENESES, A. V. *et al.* Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic. **Clinical Microbiology and Infection**, v.22, n.8, p.739, Aug. 2016.

IBARRA-MENESES, A. V.; MORENO, J.; CARRILLO, E. New strategies and biomarkers for the control of visceral Leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v.36, n.1, p.29-38, Jan. 2019.

IYER, S. S.; CHENG, G. Role of regulation of interleukin 10 transcription in inflammation and autoimmune disease. **Critical Reviews in Immunology**, v.32, n.1, Jan. 2012.

KALANI, M.; CHOOPANIZADEH, M.; RASOULI, M. Influence of genetic variants of gamma interferon, interleukins 10 and 12 on Visceral Leishmaniasis in an endemic area, Iran. **Pathogens and Global Health**, v.113, n.1, p.14-19, Feb, 2019.

KBAICH, M. A. *et al.* New epidemiological pattern of cutaneous Leishmaniasis in two pre-Saharan arid provinces, southern Morocco. **Acta Tropica**, Basileia, v.173, p.11-16, Sep. 2017.

KHAN, M. G. M. *et al.* Comparison of PCR-based diagnoses for visceral Leishmaniasis in Bangladesh. **Parasitology international**, v.63, n.2, p.327-331, Apr. 2014.

KUMAR, A. Immunological determinants, host immune responses, and animal models of visceral Leishmaniasis. In: Pathogenesis, Treatment and Prevention of Leishmaniasis. **Academic Press**, p. 231-250, Jan. 2021.

KUPANI, M. *et al.* IL-10 and TGF- β Induced arginase expression contributes to deficient nitric oxide response in human visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p.944, Feb. 2021.

KWOK, A. J.; MENTZER, A.; KNIGHT, J. C. Host genetics and infectious disease: new tools, insights and translational opportunities. **Nature Reviews Genetics**, London, v.22, n.3, p.137-153, Dec. 2021.

LAINSON, R.; MILES, M. A.; SHAW, J. J. On the identification of viscerotropic

Leishmanias. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.75, n.2, p.251-253, Mar. 1981.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in the New World. In L Collier, A Balows, M Sussman (eds), **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th ed., Parasitology, Arnold, London**, v. 5, p.313-349, 2005.

LIAO, Y. H. *et al.* Genetic determinants of circulating galectin-3 levels in patients with coronary artery disease. **Molecular genetics & genomic medicine**, v.8, n.9, p.e1370, Sep. 2020.

LIMA, I. P. *et al.* Human immunodeficiency virus/*Leishmania infantum* in the first foci of urban American visceral Leishmaniasis: clinical presentation from 1994 to 2010. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.46, n.2, p.156–160, Mar-Apr. 2013.

LIMA, U. R. S. *et al.* Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil: What is the impact of HIV on this protozoan infection?. **PloS one**, Califórnia, v.14, n.12, p.e0225875, Dec. 2019.

LINDOSO, J. A. *et al.* Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PloS Neglected Tropical Diseases**, Califórnia, v.8, n.9, p.3136, Sep. 2014.

LINDOSO, J. A. L. *et al.* Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. **Hiv/aids (Auckland, NZ)**, v.10, p.193, Out. 2018.

LÓPEZ-COTARELO, P. *et al.* Beyond chemoattraction: multifunctionality of chemokine receptors in leukocytes. **Trends in immunology**, v.38, n.12, p.927-941, Dec. 2017.

LOPEZ-VELEZ, R. *et al.* Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Arlington, v.58, n.4, p.436-443, Apr. 1998.

LUKES, J. *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, n.22, p.9375-9380, May, 2007.

LUZ, Z. M. P. Debate sobre o artigo de von Zuben & Donalísio. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.32, n.6, p.CO020616, Jun. 2016.

LUZ, J. G. G. *et al.* Human visceral leishmaniasis in Central-Western Brazil: Spatial patterns and its correlation with socioeconomic aspects, environmental indices and canine infection. **Acta Tropica**, v.221, p.105965, 2021.

MAKSOUUD, S. *et al.* *Leishmania donovani* and HIV co-infection in vitro: Identification and characterization of main molecular players. **Acta Tropica**, Basileia, v.228, p.106248, Apr. 2022.

- MANN, S. *et al.* A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, p.1-12, Mar, 2021.
- MARTINEZ, E. *et al.* RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species: design of specific primers for *L. braziliensis*. **Parasitology**, Cambridge, v.127, n.6, p.513-517, Dec. 2003.
- MAURICIO, I. L. *et al.* Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, Cambridge, v.119, n.3, p.237-246, Sep. 1999.
- MAYANJA-KIZZA, H. *et al.* Activation of β -chemokines and CCR5 in persons infected with human immunodeficiency virus type 1 and tuberculosis. **The Journal of infectious diseases**, Oxford, v.183, n.12, p.1801-1804, Jun. 2001.
- MAZIRE, P.; AGARWAL, V.; ROY, A. Road-map of pre-clinical treatment for Visceral Leishmaniasis. **Drug Development Research**, Apr. 2021.
- MERIDA-DE-BARROS, D. A. *et al.* Leishmaniasis and glycosaminoglycans: a future therapeutic strategy?. **Parasites & vectors**, v.11, n.1, p.1-12, Oct. 2018.
- MITTAL, S. K. *et al.* Interleukin 10 (IL10)-mediated immunosuppression: March-I induction regulates antigen presentation by macrophages but not dendritic cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.290, n.45, p.27158-27167, Nov. 2015.
- MOREIRA, D. S. Análise fosfoproteômica e genômica funcional de linhagens de *Leishmania* spp. Sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente. Tese (Doutorado em Ciências), Belo Horizonte, 2017.
- NASCIMENTO, M. S. L. *et al.* Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **The Journal of infectious diseases**, Oxford, v.211, n.6, p.1015-1026, Mar. 2015.
- NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.
- NIGRO, L. *et al.* CCR5 and CCR3 expression on T CD3+ lymphocytes from HIV/*Leishmania* co-infected subjects. **Medical Microbiology and Immunology**, v.196, n.4, p.253-255, Dec. 2007.
- OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. **Immunologic Research**, Basel, v.56, p.163-171, May, 2013.
- OLIVIER, M. *et al.* The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology**, v.97, n.2, p. S79–S98, Oct. 2003.
- OMONDI, Z. N. *et al.* Host–Parasite Interactions: Regulation of *Leishmania* Infection in Sand Fly. **Acta Parasitologica**, p.1-13, June, 2022.
- ORYAN, A.; AKBARI, M. “Worldwide risk factors in Leishmaniasis”. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Distrito de Longhua, v.9, n.10, p.925–932, Oct. 2016.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Plano Integrado de Ações para o Enfretamento às Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco/ SANAR – 2019 - 2022** / Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. – Recife: Secretaria Estadual de Saúde, 2020; 52p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

PITTA, M. G. R. *et al.* IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of clinical investigation**, Michigan, v.119, n.8, p.2379-2387, Aug. 2009.

RANI, M. *et al.* Addison's disease with primary hypothyroidism in a case of visceral Leishmaniasis and HIV coinfection. **BMJ Case Reports CP**, London, v.14, n.3, p.e238488, Sep. 2021.

REGO, F. D.; SOARES, R. P. *Lutzomyia longipalpis*: an update on this sand fly vector. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.93, Apr. 2021.

REZAEI, Z. *et al.* High frequency of subclinical *Leishmania* infection among HIV-infected patients living in the endemic areas of visceral leishmaniasis in Fars province, southern Iran. **Parasitology research**, v.117, n.8, p.2591-2595, Aug, 2018.

RIERA, C. *et al.* Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.23, n.12, p.899-904, Dec, 2004.

RODRÍGUEZ, N. E. *et al.* Epidemiological and experimental evidence for sex-dependent differences in the outcome of *Leishmania infantum* infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Arlington, v.98, n.1, p.142, Jan. 2018.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British medical journal**, Londres, v.2, n.2237, p.1261, Nov. 1903.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!. **International Immunology**, Oxford, v.30, n.3, p.103-111, Mar. 2018.

RUANG-AREERATE, T. *et al.* Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay using SYBR safe and gold-nanoparticle probe for detection of *Leishmania* in HIV patients. **Scientific reports**, v.11, n.1, p.1-11, June, 2021.

SAF'JANOVA, V. M. Classification of the genus *Leishmania* Ross. **In the Leishmanias. Protozoology, Part 7**, v.220, 1982.

SALHI, A. *et al.* Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. **The Journal of**

Immunology, Rockville, v.180, n.9, p.6139-6148, May, 2008.

SARAIVA, M.; VIEIRA, P.; O’GARRA, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **Journal of Experimental Medicine**, v.217, n.1, Jan, 2020.

SCHAFER, B. *et al.* Inhibition of multidrug-resistant HIV-1 by interference with cellular S-adenosylmethionine decarboxylase activity. **The Journal of infectious diseases**, New York, v.194, n.6, p.740-750, 2006.

SILVA, A. A. *et al.* Galectin-3: a friend but not a foe during *Trypanosoma cruzi* experimental infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v.7, p.463, Nov. 2017.

SILVA, E. D. *et al.* Case study of a patient with HIV-AIDS and visceral Leishmaniasis co-infection in multiple episodes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.55, p.425-428, Nov-Dec. 2013.

SINGH, N.; SUNDAR, S. Inflammatory chemokines and their receptors in human visceral Leishmaniasis: gene expression profile in peripheral blood, splenic cellular sources and their impact on trafficking of inflammatory cells. **Molecular immunology**, v.85, p.111-119, Feb. 2017.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Developments in diagnosis of visceral Leishmaniasis in the elimination era. **Journal of parasitology research**, v.2015, Dec. 2015.

SINGH, S. Changing trends in the epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of *Leishmania*–HIV co-infection in India. **International Journal of Infectious Diseases**, v.29, p.103-112, Dec. 2014.

SISAY, Z. *et al.* Serum chemokine profiles in visceral Leishmaniasis, HIV and HIV/visceral Leishmaniasis co-infected Ethiopian patients. **Ethiopian medical journal**, Addis Ababa, v.49, n.3, p.179-186, July, 2011.

SNIDER, H. *et al.* Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis. **Neuroimmunomodulation**, Basileia, v.16, n.2, p.106-113, Oct. 2009.

SOUSA, J. M. S.; RAMALHO, W. M.; MELO, M. A. Demographic and clinical characterization of human visceral Leishmaniasis in the State of Pernambuco, Brazil between 2006 and 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.51, p.622-630, Sep-Oct. 2018.

SOUSA-GOMES, M. L.; ROMERO, G. A. S.; WERNECK, G. L. Visceral Leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough?. **PLoS neglected tropical diseases**, Califórnia, v.11, n.9, p.e0005772, Sep. 2017.

SRIVASTAVA, P. *et al.* Diagnosis of visceral Leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Arlington, v.105, n.1, p.1–6, Jan, 2011.

STRING: functional protein association networks. STRING, 2022. Disponível em: <https://string-db.org>. Acesso em: 20 Jan. 2022.

SUNDAR, S.; SINGH, O. P. Molecular diagnosis of visceral leishmaniasis. **Molecular diagnosis & therapy**, v.22, n.4, p.443-457, Aug. 2018.

TAKELE, Y. *et al.* Arginase activity in the blood of patients with visceral Leishmaniasis and HIV infection. **PLoS neglected tropical diseases**, Califórnia, v.7, n.1, p.e1977, Jan. 2013.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **TaqMan Assays**. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>. Acesso em: 17 out. 2021.

TKACHUK, A. N. *et al.* Malaria enhances expression of CC chemokine receptor 5 on placental macrophages. **The Journal of infectious diseases**, Oxford, v.183, n.6, p.967-972, Mar. 2001.

TORRES, T. S. *et al.* Low socioeconomic status is associated with self-reported HIV positive status among young MSM in Brazil and Peru. **BMC Infectious Diseases**, v.21, n.1, p.1-9, 2021.

VALLEJO, A. *et al.* High levels of CD4+ CTLA-4+ Treg cells and CCR5 density in HIV-1-infected patients with visceral Leishmaniasis. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v.34, n.2, p.267-275, Feb. 2015.

VAN GRIENSVEN, J. *et al.* Longitudinal evaluation of asymptomatic Leishmania infection in HIV-infected individuals in North-West Ethiopia: A pilot study. **PLoS neglected tropical diseases**, Califórnia, v.13, n.10, p.e0007765, Out. 2019.

VIEIRA, A. V. B. *et al.* Evaluation of molecular techniques to visceral Leishmaniasis detection in asymptomatic patients: a systematic review. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, p.1-12, May, 2021.

VILAPLANA, C. *et al.* Noninvasive method for diagnosis of visceral Leishmaniasis by a latex agglutination test for detection of antigens in urine samples. **Journal of clinical microbiology**, v.42, n.4, p.1853-1854, Apr. 2004.

VOGT, F. *et al.* Antigen detection in urine for noninvasive diagnosis and treatment monitoring of visceral Leishmaniasis in human immunodeficiency virus coinfecting patients: an exploratory analysis from Ethiopia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Arlington, v.99, n.4, p.957, Oct. 2018.

WANG, C. *et al.* Relationships between tumour necrosis factor- α , interleukin-12B and interleukin-10 gene polymorphisms and hepatitis B in Chinese Han haemodialysis patients. **Nephrology**, v.17, n.2, p.167-174, Feb. 2012.

WEIRATHER, J. L. *et al.* Fine mapping under linkage peaks for symptomatic or asymptomatic outcomes of *Leishmania infantum* infection in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v.43, p.1-5, Sep. 2016.

WERNECK, G. L. The control of visceral Leishmaniasis in Brazil: end of a cycle?. **Cadernos De Saude Pública**, Rio de Janeiro, v.32, June, 2016.

WOLDAY, D. *et al.* Role of *Leishmania donovani* and Its Lipophosphoglycan in CD4+ T-cell Activation-Induced Human Immunodeficiency Virus replication. **Infect. Immun.**, v.67, n.10, p.5258-5264, Oct. 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [webpage on the Internet]. Leishmaniasis; 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Leishmaniasis>. Acesso em: 25 fev. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [webpage on the Internet]. Leishmaniasis; 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Leishmaniasis>. Acesso em: 30 jan. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [webpage on the Internet]. Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. World Health Organization, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [webpage on the Internet]. Report of the fifth consultative meeting on *Leishmania*-HIV coinfection, Addis Ababa, Ethiopia, 20–22 March 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. [webpage on the Internet]. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: WHO publishes new guideline with region-specific treatment recommendations. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/08-06-2022-visceral-leishmaniasis-and-HIV-coinfection-WHO-publishes-new-guideline-with-region-specific-treatment-recommendations>. Acesso em: 10 fev. 2021.

WU, Y. *et al.* Application of quantitative PCR in the diagnosis and evaluating treatment efficacy of Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.10, p.587, Oct, 2020.

XU, W. D. *et al.* Gene polymorphisms of *LGALS2*, *LGALS3* and *LGALS9* in patients with rheumatoid arthritis. **Cellular Immunology**, v.368, p.104419, Oct. 2021.

ZHANG, Y. *et al.* Influence of *LGALS3* gene polymorphisms on susceptibility and prognosis of dilated cardiomyopathy in a Northern Han Chinese population. **Gene**, v. 642, p. 293-298, Feb. 2018.

ZHAO, C. *et al.* In primary human monocyte-derived macrophages exposed to Human immunodeficiency virus type 1, does the increased intracellular growth of *Leishmania infantum* rely on its enhanced uptake?. **Journal of general virology**, v.87, n.5, p. 1295-1302, May, 2006.

ZOHAR, Y. *et al.* CXCL11-dependent induction of FOXP3-negative regulatory T cells suppresses autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of clinical investigation**, v.124, n.5, p.2009-2022, May. 2014.

ZUBEN, A. P. B. V.; DONALÍSIO, M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.32, June, 2016.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: "Estudo de fatores genéticos e epigenéticos envolvidos na susceptibilidade a Leishmaniose Visceral em pacientes coinfectados com HIV."

Pesquisador responsável: Walter Lins Barbosa Júnior

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 20/10/2016

Registro no CAAE: 61218816.1.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 1.870.364

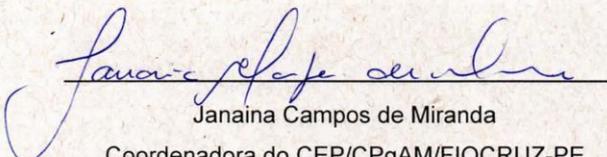
PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

O CEP/CPqAM reforça a necessidade de entrega de relatórios parcial e final, em cumprimento a resolução 466/12, capítulo XI, artigo 2d.

Recife, 20 de dezembro de 2016.


Janaina Campos de Miranda
Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE

Janaina Campos de Miranda
Pesquisadora em Saúde Pública
Coordenadora
Mat. SIAPE 464777
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br


Centro de Pesquisas
AGGEU
MAGALHÃES


FIOCRUZ
Ministério da Saúde

ANEXO B - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE FATORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS ENVOLVIDOS NA SUSCEPTIBILIDADE A LEISHMANIOSE VISCERAL EM PACIENTES COINFECTADOS COM HIV

Pesquisador: Walter Lins Barbosa Júnior

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61218816.1.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Solicito a manutenção desse projeto para realização de novos ensaios e análises de

Data do Envio: 07/04/2020

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.022.613

Apresentação da Notificação:

A notificação foi apresentada no formato exigido.

O referido projeto tem como propósito investigar polimorfismos genéticos dos genes SLC11A1, LECT2, CCL1, CCL16, e IL4 e a expressão dos miRNAs hsa-mir122 e hsa-mir210-3p em pacientes coinfetados com leishmaniose visceral/HIV, para tal, serão utilizadas as amostras provenientes de biorrepositório de soro e DNA oriundos de quatro projetos que foram aprovados pelo CEP do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

Objetivo da Notificação:

Apresentar relatório parcial do projeto ainda em execução.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e os benefícios estão descritos no projeto original e foram analisados e aprovados

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 4.022.613

quando da avaliação do projeto.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

A notificação apresenta em sua descrição informações merecedoras de EMENDA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos para uma notificação estão corretos.

Recomendações:

Foram identificadas alterações no projeto que devem ser oficializadas através da apresentação de EMENDA.

Segue os ajustes a serem apresentados na EMENDA:

Cronograma: Deverá justificar a alteração do cronograma e alterá-lo.

Método: Está relatado que houve modificação. "Utilização de amostras obtidas apenas no Centro de Aconselhamento e Testagem (SAE/CTA) do município de Petrolina, Mesorregião do Rio São Francisco."

Equipe: Houve inclusões e exclusões na equipe, deverá apresentar novos termos na EMENDA. Solicitamos que sejam incluídos termos de participação da equipe (dos novos integrantes) e termos de saída da equipe (dos membros que não mais compõem a equipe do projeto).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A referida Notificação Parcial está adequada e, portando o CEP/IAM recomenda a aprovação. No entanto, foram identificadas informações que devem ser oficializadas por EMENDA. Deste modo, as alterações no projeto só serão aceitas e aprovadas após avaliação da EMENDA.

Considerações Finais a critério do CEP:

Notificação aprovada, no entanto deverá apresentar EMENDA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	Relatorio_parcial_CEP_07_04_2020.pdf	07/04/2020 13:00:41	Walter Lins Barbosa Júnior	Postad

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 4.022.613

Não

RECIFE, 12 de Maio de 2020

Assinado por:
EVANIA FREIRES GALINDO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br