

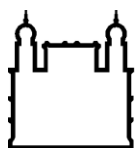
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

INFLUÊNCIA DO GRAU DE ATIVAÇÃO CELULAR DE LINFÓCITOS T NO
PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL
COINFECTADOS PELO HIV-1 ACOMPANHADOS
PROSPECTIVAMENTE

MARIA LUCIANA SILVA DE FREITAS

Rio de Janeiro
Dezembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MARIA LUCIANA SILVA DE FREITAS

Influência do grau de ativação celular de linfócitos T no prognóstico de pacientes com leishmaniose visceral coinfetados pelo HIV-1 acompanhados prospectivamente

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

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

RIO DE JANEIRO
Dezembro de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

F866 Freitas, Maria Luciana Silva de

Influência do grau de ativação celular de linfócitos T no prognóstico de pacientes com Leishmaniose visceral coinfetados pelo HIV-1 acompanhados prospectivamente / Maria Luciana Silva de Freitas. – Rio de Janeiro, 2015.

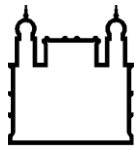
xvi, 117 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.

Bibliografia: f. 67-75

1. Coinfecção Leishmania/HIV-1. 2. Ativação celular. 3. Recidivas. 4. Imunosenescência. 5. Translocação microbiana. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: MARIA LUCIANA SILVA DE FREITAS

**INFLUÊNCIA DO GRAU DE ATIVAÇÃO CELULAR DE LINFÓCITOS T NO
PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM LÉISHMANIOSE VISCERAL COINFECTADOS
PELO HIV-1 ACOMPANHADOS PROSPECTIVAMENTE**

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

Aprovada em: 22/12/2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Wilson Savino – Presidente (IOC/Fiocruz)

Prof^a. Dra. Cleonice Alves de Melo Bento (UNIRIO-RJ)

Prof^a. Dra. Carmem Beatriz Giacoia-Gripp - Revisora (IOC/Fiocruz)

Prof. Dr. Adriano Gomes-Silva – Suplente (INI/Fiocruz)

Prof^a. Dra. Juliene Antonio Ramos – Suplente (IFRJ-RJ)

Rio de Janeiro, 22 de Dezembro de 2015.

A Deus. Ao meu esposo, Rafael. Aos meus pais, Verônica e Ageu. À minha irmã, Elizabety. Aos meus avós, Pedro e Josefa (*in memoriam*). Às minhas tias, Fernanda e Jaqueline.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido o dom da vida e por ter me levado a lugares inimagináveis, me abençoando com uma família e com amigos que estão sempre ao meu lado.

Agradeço aos meus pais, pois sem eles nada disso seria possível. À minha mãe, Verônica, por sempre ter lutado e persistido para o meu bem, sempre me incentivando a buscar o melhor. Meu pai, Ageu, por sempre batalhar pela nossa educação. Ao meu esposo, Rafael, por ser meu porto seguro e por estar ao meu lado seja nos momentos de alegria como nos de tristeza, por toda a paciência que teve durante esse período de tanto estresse, e por apoiar sempre o meu crescimento profissional e pessoal. À minha irmã, Elizabety, que mesmo tão jovem é sempre tão madura para me apoiar, me aconselhar nos momentos em que mais preciso. À minha família, que mesmo estando tão longe, sempre demonstraram ter tanto orgulho das minhas conquistas, e que foram essenciais na formação do meu caráter durante os momentos em que vivíamos juntos. Aos meus sogros, por me fazerem sentir sempre tão especial. Amo muito cada um de vocês, de uma forma que palavras não podem explicar.

Agradeço às minhas queridas orientadoras, Joanna Reis e Alda Maria, por terem me acolhido de forma tão calorosa e por serem exemplos de amor e dedicação a ciência. Agradeço à Joanna Reis por ter confiado em me orientar desde a iniciação científica, e por ser acima de tudo uma grande amiga e alguém ao qual me orgulho em se espelhar.

Agradeço imensamente a todos os meus queridos amigos do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, por sempre se mostrarem tão acolhedores, amigáveis e companheiros, e por sempre estarem dispostos a ajudar em experimentos, discussões científicas e etc.

Agradeço às Dra. Glaucia Cota e a Dra. Ana Rabello por colaborarem de forma muito dedicada e produtiva com o desenvolvimento deste projeto, e pelo recrutamento e acompanhamento dos pacientes.

À toda equipe do Laboratório de Aids e Imunologia Molecular por disponibilizarem seu laboratório como ambiente de trabalho e por colaborarem sempre com muita dedicação com este projeto, através dos serviços de referência que nos foram concedidos. Em especial, à adorável Dra. Carmem Giacoia-Gripp por ser sempre

tão atenciosa e por ter aceitado o desafio de revisar em tempo tão curto esta dissertação.

Aos membros da banca examinadora que prontamente aceitaram o convite, mesmo em meio a um curto período de tempo e a datas tão especiais; com certeza todos serão indispensáveis para o crescimento do trabalho.

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

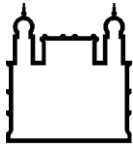
Agradeço às minhas amigas e madrinhas, Deborah e Maísa, pelos quase 11 anos de amizade e companheirismo. Aos meus padrinhos, Sônia e Rubens, por sempre ficarem tão felizes com minhas conquistas e por sempre me apoiarem.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Imunobiofísica da UFRJ, em especial ao Hercules, por ter me apresentado de forma tão especial a vida científica.

Ao auxílio Universal/CNPq pelo financiamento do projeto, sem o qual este trabalho não poderia estar sendo realizado. Da mesma maneira, ao IOC pelo suporte financeiro.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado (2014-2016).

Dêem Graças ao Senhor porque Ele é bom; o seu amor dura para sempre (Salmos 107:1)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

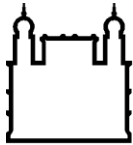
INFLUÊNCIA DO GRAU DE ATIVAÇÃO CELULAR DE LINFÓCITOS T NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL COINFECTADOS PELO HIV-1 ACOMPANHADOS PROSPECTIVAMENTE

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Maria Luciana Silva de Freitas

A ativação imune crônica e a depleção linfocitária são marcantes na infecção pelo HIV-1 e pela *Leishmania infatum*. Esta ativação tem sido associada à exaustão do sistema imune em pacientes infectados pelo HIV e pode contribuir para as frequentes recidivas de leishmaniose visceral (LV) em pacientes LV/HIV-1. Assim, é importante investigar se a manutenção do tratamento anti-*Leishmania* combinado à terapia antirretroviral (TARV) é capaz de diminuir os níveis de ativação e, conseqüentemente, reduzir o número de recidivas da LV. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o grau de ativação celular e o seu impacto sobre o comprometimento imunológico, em pacientes LV/HIV-1, assim como determinar sua influência no prognóstico (recidiva ou remissão clínica) pós-tratamento anti-*Leishmania* dos pacientes coinfectados. Os pacientes foram divididos em: Não-recidivantes (NR;n=6) e Recidivantes (R;n=11). Ambos os grupos foram seguidos da fase ativa até 12 meses pós-tratamento (mpt), sendo mantidos sob TARV e em uso de profilaxia secundária com anfotericina B (50mg/quinzenal), desde o final do tto da LV. As contagens de TCD4⁺, grau de ativação (CD38⁺HLA-DR⁺), imunosenescência (CD57⁺CD27⁻), níveis de CD14 solúvel e anticorpos anti-*Leishmania* foram avaliados para os pacientes e voluntários sadios. Durante a fase ativa da LV, ambos os grupos apresentaram níveis similares de todos os parâmetros avaliados. Entretanto, nos períodos de 6 e 12 mpt, o grupo NR mostrou um ganho significativo de células TCD4⁺, bem como uma diminuição dos percentuais de linfócitos TCD4 e TCD8 ativados, diferente do grupo R, que manteve uma baixa reconstituição imunológica, um alto grau de ativação em ambas as subpopulações de TCD8⁺ e CD4⁺ (p<0,0001 e p<0,01, respectivamente), além de níveis elevados de sCD14 (p<0,05), sugerindo um persistente grau de ativação imune entre pacientes R. As cargas viral e parasitária permaneceram baixas ou indetectáveis sem correlação com a ativação. Entretanto, tal ativação se correlacionou negativamente com o dano na recuperação imunológica desses pacientes. Apesar dessas diferenças, os percentuais de linfócitos T senescentes foram similarmente elevados entre os grupos R e NR. A menor capacidade do grupo R em reduzir os níveis de ativação celular em comparação ao NR, pode estar relacionada ao comprometimento da resposta efetora, que decai a cada episódio de recidiva. Além disso, a profilaxia secundária parece modificar a história natural dos pacientes coinfectados que estão experienciando o primeiro episódio da doença, ao contrário daqueles que já apresentam várias recidivas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INFLUENCE OF THE CELL ACTIVATION DEGREE OF T LYMPHOCYTES IN THE PROGNOSIS OF PATIENTS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS COINFECTED WITH HIV-1

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Maria Luciana Silva de Freitas

Chronic immune activation and lymphocytic depletion are striking features in HIV-1 and *Leishmania infatum* infection. Such activation has been associated with the exhaustion of the immune system in HIV⁺ patients and can contribute to frequent recurrences of visceral leishmaniasis (VL) in coinfecting patients. Therefore, it is important to investigate whether maintenance of anti-*Leishmania* treatment combined with antiretroviral therapy (ART) is able to decrease the levels of cellular activation and hence reduce the number of VL relapses. In this way, the aim of this study was to evaluate the cellular activation degree and its impact on the immune impairment in VL/HIV patients, as well as to determine their influence on prognosis (relapse or clinical remission) after anti-*Leishmania* treatment. The patients were divided into non-recurrent (NR; n=6) and recurrent (R; n=11). Both groups were followed by active phase up to 12 months post-treatment (mpt). They were on ART and use of secondary prophylaxis with amphotericin B (50mg/fortnightly) from the end of the VL treatment. CD4⁺ T cell counts, activation degree (CD38⁺/HLA-DR⁺), immunosenescence (CD57⁺/CD27⁻), soluble CD14 levels and anti-*Leishmania* antibodies were evaluated in the patients and healthy controls. During the active phase of VL, both groups had similar levels of all parameters. However, at 6 and 12 mpt, the NR group showed a significant gain in CD4⁺T cells, as well as a decrease in the percentage of activated CD4 and CD8 T lymphocytes. Unlikely, R group kept a low immune reconstitution, a high degree of activation of both CD4 and CD8 subpopulations ($p < 0.0001$ and $p < 0.01$, respectively), and high levels of sCD14 ($p < 0.05$), suggesting a persistent level of immune activation in R coinfecting patients. Viral and parasite load remained low or undetectable with no correlation with activation. However, this activation degree was negatively correlated with impaired immune reconstitution of patients. Despite these differences, the percentages of senescent T lymphocytes were similarly high between R and NR groups. The smaller capacity of the R group in reducing cell activation levels compared to NR, may be related to some functional impairment of effector response that has been declining every recurrence episode. In addition, secondary prophylaxis seems to modify the natural history of co-infected patients who are presenting the first episode of the disease, as opposed to those who already have several recurrences.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia da associação leishmaniose visceral e HIV-1/AIDS (LV/HIV-1)	1
1.2 Imunopatogênese da leishmaniose visceral (LV)	6
1.3 Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1	11
1.4 Imunopatogênese da associação leishmaniose visceral/HIV-1 (LV/HIV-1)	21
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Casuística, Considerações Éticas e Aspectos Clínicos	27
3.2 Obtenção de material biológico para ensaios laboratoriais	29
3.3 Monitoramento imunológico e virológico da infecção pelo HIV-1	29
3.4 Quantificação da Carga Parasitária	30
3.5 Isolamento e caracterização fenotípica das células mononucleares de sangue periférico	31
3.6 Quantificação dos fatores solúveis associados à translocação de produtos microbianos	35
3.7 Dosagem sérica de Imunoglobulinas IgG e subclasses IgG1 e IgG3 anti- <i>Leishmania</i>	35
3.8 Análise estatística	36

4. RESULTADOS	37
4.1 Características clínicas, demográficas e curso evolutivo dos pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1)	37
4.2 Avaliação do grau de comprometimento imunológico dos pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1)	41
4.3 Avaliação dos parâmetros virológicos e parasitológicos dos pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1)	44
4.4 Avaliação do grau de ativação celular dos pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1, acompanhados prospectivamente	46
4.5 Avaliação do <i>status</i> inflamatório e ativado do sistema imune, através dos níveis de translocação microbiana em pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1)	48
4.6 Avaliação dos níveis de imunoglobulinas (Igs) da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG3 nos pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1) ao longo do acompanhamento prospectivo	52
4.7 Avaliação prospectiva do grau de imunosenescência de linfócitos T em pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1)	55
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. ANEXOS	76
ANEXO A – Termos de consentimento livre e esclarecido	77
ANEXO B – Aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	83
ANEXO C – Produção Científica	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Números absolutos e proporção relativa dos casos de leishmaniose visceral (LV) notificados que estavam infectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1).	5
Figura 2: Manifestações clínicas da leishmaniose visceral.	7
Figura 3: Curso clínico natural da infecção pelo HIV-1 na ausência de TARV.	
Figura 4: Modelo de análise da coexpressão fenotípica dos marcadores de ativação celular HLA-DR e CD38.	33
Figura 5: Modelo de análise da expressão fenotípica dos marcadores de senescência celular CD57 ⁺ /CD27 ⁻ .	34
Figura 6: Distribuição das contagens absolutas de linfócitos T CD4 ⁺ apresentadas pelos pacientes com leishmaniose visceral coinfectedados pelo HIV-1 (LV/HIV-1), nas diferentes fases do acompanhamento prospectivo.	42
Figura 7: Perfil das contagens absolutas de linfócitos T CD4 ⁺ apresentadas pelos pacientes com leishmaniose visceral coinfectedados pelo HIV-1 (LV/HIV-1), que apresentaram um único episódio ativo da LV (NR) ou com frequentes recidivas da doença (R).	43
Figura 8: Percentuais de coexpressão dos marcadores de ativação celular CD38 e HLA-DR nos linfócitos T CD4 ⁺ (A) e CD8 ⁺ (B), em pacientes LV/HIV-1, nas diferentes fases do estudo.	47
Figura 9: Níveis de CD14 solúvel (sCD14) no plasma de pacientes com leishmaniose visceral coinfectedados pelo HIV-1 (LV/HIV-1), nas diferentes fases do estudo.	49
Figura 10: Relação entre fatores plasmáticos associados à translocação microbiana e o <i>status</i> imune apresentado por pacientes com leishmaniose visceral coinfectedados pelo HIV-1 (LV/HIV-1).	51
Figura 11: Níveis de Imunoglobulina G (IgG) (A) e suas subclasses IgG1 e IgG3 anti- <i>Leishmania</i> (B e C) no soro de pacientes com leishmaniose visceral coinfectedados pelo HIV-1 (LV/HIV-1), ao longo do acompanhamento.	54
Figura 12: Percentuais de expressão do fenótipo CD57 ⁺ CD27 ⁻ em linfócitos T CD4 ⁺ (A) e CD8 ⁺ (B) em pacientes com leishmaniose visceral coinfectedados pelo HIV-1 (LV/HIV-1).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Evolução clínica e características demográficas dos 18 pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1). **39**

Tabela 2: Número de cópias por mL de RNA viral e kDNA de *Leishmania (L.) infantum* apresentado por pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1). **45**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

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

PE	Do inglês, Ficoeritrina
PercP	Do inglês, Peridina-clorofila
IPs	Inibidores de protease
RANTES	Do inglês, Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted
RNA	Do inglês, Ácido ribonucleico
SIV	Do inglês, Vírus da imunodeficiência símia
TARV	Terapia antirretroviral altamente potente
TCR	Do inglês, Receptor de células T
TGF-β	Do inglês, Fator de crescimento tumoral beta
TNF	Do inglês, Fator de Necrose Tumoral

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da associação leishmaniose visceral e HIV-1/AIDS (LV/HIV-1)

A leishmaniose visceral (LV, também conhecida pelo nome indiano *kala-azar*, calazar) é uma zoonose de evolução crônica e envolvimento sistêmico, que se não tratada, evolui de forma desfavorável e fatal (Barata et al, 2013). De acordo com a estimativa da Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), cerca 400.000 novos casos da doença ocorrem anualmente ao redor do mundo, com uma alta endemia no subcontinente indiano, no oeste da África e nas Américas. No entanto, mais de 90% dos casos estão concentrados em seis países, sendo esses: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sul do Sudão (WHO, 2015).

Nas Américas, 38.808 novos casos de LV foram notificados entre os anos de 2001 e 2011. Apesar desse número estar distribuído entre 12 países, 96% dos casos notificados ocorreram no Brasil (37.503 casos) (Lindoso et al, 2014), afetando primariamente homens (61,7%) e crianças com idade inferior a cinco anos (36%) (Brasil, 2014). Segundo o último boletim da Secretaria de Vigilância em Saúde, foram relatados 3.253 novos casos de LV em 2013, com incidência de 1,6 por 100.000 habitantes (Brasil, 2014). Considerando a elevada taxa de subnotificação de casos e que a LV trata-se de uma doença negligenciada, estima-se que esses números sejam maiores do que o descrito no país, variando em uma faixa realista de 4.500 a 6.800 casos por ano (Lindoso et al, 2014).

No Brasil, o agente etiológico da LV é a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*, transmitida através da picada do flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*, vetor da doença no país. A raposa (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyonthus*) e o gambá (*Didelphis albiventris*) são descritos como potenciais reservatórios silvestres da doença, enquanto o cão (*Canis familiaris*) é considerado o seu reservatório doméstico, sendo identificado como a principal fonte de infecção para o vetor.

Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, o vetor infectado regurgita parte do conteúdo do seu tubo digestivo, transmitindo as

formas promastigotas metacíclicas para este e iniciando, assim, o ciclo de transmissão da doença. Essas formas promastigotas são rapidamente fagocitadas pelas células de defesa do hospedeiro, especialmente macrófagos, e dentro do vacúolo fagocítico (fagossomo) se diferenciam nas formas amastigotas. Essas últimas irão se replicar por divisão binária e, posteriormente, infectar novos macrófagos. Dessa forma, a *L. (L.) infantum* caracteriza-se como um parasito intracelular obrigatório, que infecta as células da linhagem fagocítica mononuclear de mamíferos, dentre eles os seres humanos.

Nas últimas décadas, as alterações ambientais causadas pelo homem, tais como o desmatamento, o crescimento desordenado das cidades, a presença concomitante do *Lu. longipalpis* e do reservatório doméstico, além das precárias condições de habitação da população, têm contribuído para a urbanização, expansão geográfica e emergência de novos focos da LV no Brasil. Desta forma, apesar da incidência da LV ainda ser consideravelmente elevada nas áreas rurais, a doença se encontra em constante expansão para as zonas peri-urbanas e urbanas, muito provavelmente como resultado destas alterações antropogênicas, bem como da intensa migração das populações rurais para periferias urbanas (Maia-Elkhoury et al, 2008). Tal fato tem contribuído cada vez mais para a emergência de novos casos de associação da doença com a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*), e será dissertado mais adiante.

Paralelamente, dados recentes apontam que cerca de 40 (34.3–41.4) milhões de pessoas no mundo estejam vivendo com AIDS, com uma incidência global de aproximadamente 2.0 (1.9–2.2) milhões de novos casos de infecção em 2014 (WHO, 2015). Apesar desses dados ainda serem alarmantes, tem sido observado um importante declínio no número de casos novos da infecção quando comparado, por exemplo, aos dados do ano de 2001, quando foram estimados 3.4 (3.1–3.7) milhões de novos casos de infectados pelo HIV-1 (WHO, 2015). Simultaneamente, o número de mortes pela Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) também declinou nos últimos anos, com 1.2 (1.0–1.5) milhões de mortes por AIDS em 2014, comparados aos 2.3 (2.1–2.6) milhões de óbitos pela doença em 2005 (WHO, 2015). Esses dados parecem ser reflexos do aumento simultâneo da adesão à terapia antirretroviral (TARV),

a qual vem aumentando a expectativa de vida dos pacientes HIV-1 positivos (WHO, 2015).

Na América Latina, estimativas recentes apontam que cerca de 1.7 (1.4 – 2.0) milhões de indivíduos em todas as faixas etárias estejam infectados pelo HIV-1. Em 2014, foram notificados aproximadamente 87.000 (70.000 – 100.000) mil novos casos de infecção (UNAIDS, 2015). O Brasil, por sua vez, está andando na contramão do que têm acontecido com a média global, sendo responsável por, quase metade desses números no continente latino-americano. O último Boletim do Ministério da Saúde (2015) revelou um aumento progressivo no número de novos casos de infecção pelo HIV-1 entre o período de 2007 a junho de 2015. Por exemplo, em 2007 foram notificados 5.833 casos, ao passo que em 2015, até o mês de junho, haviam sido notificados 9.419 casos, somando-se para período cerca de 93.260 novos indivíduos infectados pelo vírus, no país. Além disso, desde o início da epidemia de AIDS no Brasil, até junho de 2015, aproximadamente 798.300 casos de AIDS foram notificados.

A epidemia de HIV/AIDS no país tem se concentrado, principalmente, em populações que vivem em situações de vulnerabilidade, como homens que fazem sexo com homens (HSH), travestis, profissionais do sexo e usuários de drogas injetáveis. Além disso, tem sido observado uma constante heterossexualização, feminização, pauperização e ruralização da epidemia.

Dessa forma, o aumento da difusão da infecção pelo HIV-1 para as áreas rurais e a constante urbanização da LV podem influenciar de forma importante a epidemiologia e a história natural de ambas as infecções. É bem descrito que a presença da infecção pelo HIV-1 em áreas endêmicas para LV aumenta de 100 para 2320 vezes o risco de desenvolvimento de casos sintomáticos da doença, além de reduzir a probabilidade de uma resposta terapêutica de sucesso e aumentar a probabilidade de ocorrência de recidivas da LV (Alvar et al, 2008; Cota et al, 2011). Diante disso, a associação leishmaniose visceral/HIV-1 (LV/HIV-1) tem emergido como um desafio importante no controle da LV. Por exemplo, a infecção pelo HIV-1 em indivíduos expostos à *L. infantum* aumenta dramaticamente o risco de progressão da infecção assintomática para doença ativa, enquanto que a

presença simultânea da LV acelera dramaticamente a progressão da infecção pelo vírus para a AIDS (Alvar et al, 2008).

Atualmente, a associação LV/HIV-1 tem sido descrita em 35 países ao redor do mundo (WHO, 2015), emergindo como uma entidade patológica grave em algumas áreas do leste da África, particularmente no norte da Etiópia (Van Griensven et al, 2014), bem como em várias outras regiões do mundo. Estima-se que um terço dos casos de infecção pelo HIV-1 no mundo ocorra em áreas de risco para a transmissão de leishmaniose (Leite de Sousa-Gomes et al, 2011). Na América do Sul, por sua vez, o número de casos da associação LV/HIV-1 também se encontra em constante ascensão, contando com uma incidência de aproximadamente 6% de indivíduos coinfectados, em 2011 (Van Griensven et al, 2014). No entanto, é muito provável que esses dados estejam subestimados, uma vez que a LV ainda não está inclusa entre as doenças oportunistas definidoras de AIDS listadas pela OMS e, portanto, dificilmente é reportada no sistema de notificações de casos de AIDS (Pintado & López-Vélez, 2014). Como já comentado, a ocorrência de casos de associação LV/HIV-1 tem sido relacionada, principalmente, ao aumento da sobreposição geográfica de ambas as infecções, uma vez que a LV está cada vez mais presente nas áreas urbanas, e a infecção pelo HIV-1 se encontra em constante interiorização no país (Brasil, 2014).

Em 1990, o Brasil registrou o primeiro caso de coinfeção *Leishmania*/HIV-1 ocorrido nas Américas (Nicodemo et al, 1990). Posteriormente, em 2003, foi realizado o primeiro estudo de casos *Leishmania*/HIV-1 ocorridos no país, no qual foi demonstrado que 37% dos pacientes coinfectados avaliados apresentavam a forma visceral da doença (Rabello et al, 2003). A partir dessa primeira iniciativa, o Ministério da Saúde fortaleceu os centros nacionais de referência em HIV e leishmanioses, a fim de melhorar o diagnóstico precoce e o tratamento adequado para a coinfeção *Leishmania*/HIV-1. De acordo com suas recomendações, deve-se oferecer sorologia para o diagnóstico de infecção pelo HIV-1 a todos os pacientes com LV e leishmaniose tegumentar (LT), independentemente da idade (Brasil, 2011). Em outras palavras, quando um indivíduo é diagnosticado com LV, ou LT, um teste rápido para diagnóstico da infecção pelo HIV-1/2 deve ser oferecido nas Unidades de Pronto-Atendimento (UPAs) por médicos e/ou

enfermeiros, independentemente da realização de teste anterior, e com os devidos aconselhamentos pré e pós-teste (Brasil, 2011).

Atualmente, o Brasil é considerado o país com maior número de casos dessa associação no continente americano, apresentando um aumento expressivo desses valores nos últimos anos. Em 2001, aproximadamente 0,7% dos casos de LV notificados estavam infectados pelo HIV-1, ao passo que em 2012 esse percentual aumentou consideravelmente para 8,5% dos casos registrados (Figura 1) (Lindoso et al, 2014). Informações mais recentes apontam que, hoje o país conte com uma incidência de aproximadamente 9,3% dos casos de associação LV/HIV-1 (Maia-Elkhoury, OPAS, comunicação pessoal, 2015). Aliado a esse fato, a distribuição epidemiológica desses casos ainda tem acompanhado os grupos de risco para a transmissão do HIV, seja pela faixa etária (aproximadamente 37 anos de idade), pelo sexo (91,9% do sexo masculino) (Rabello et al, 2003), ou por práticas de alto risco para infecção.

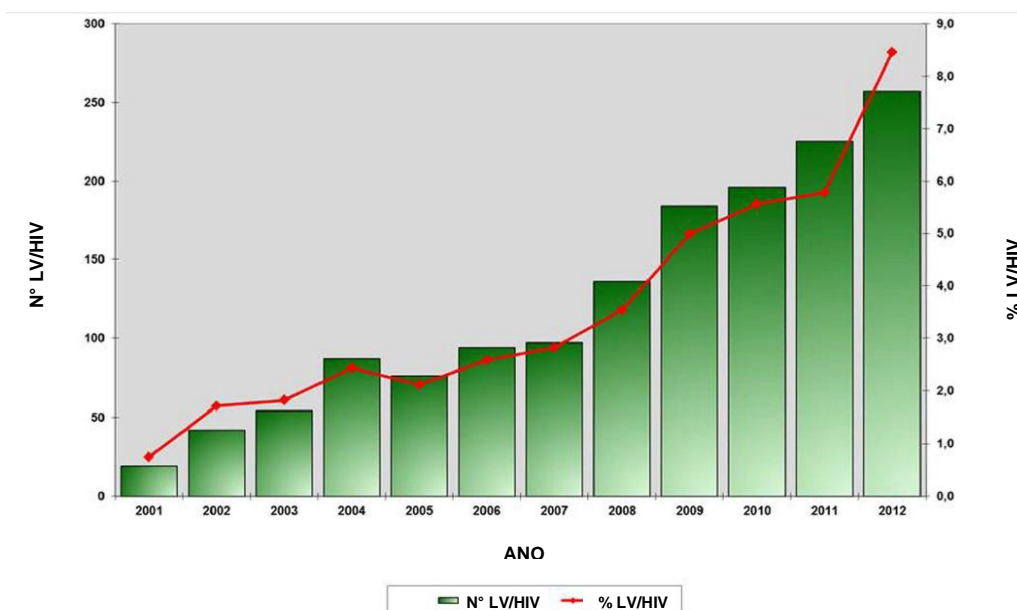


Figura 1: Números absolutos e proporção relativa dos casos de leishmaniose visceral (LV) notificados que estavam infectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1). Número e proporção de casos de associação LV/HIV-1 no Brasil referente ao período de 2001 a 2012. Fonte: Lindoso et al., 2014 (Ministério da Saúde).

Do ponto de vista clínico, a coinfeção pelo HIV-1 acelera o desenvolvimento da LV ativa, que se manifesta, principalmente, em decorrência da grave imunossupressão apresentada pelos pacientes de HIV-1, aumentando a significância epidemiológica dos casos assintomáticos (Griensven et al, 2014). Dessa forma, a associação com o HIV-1 tem resultado em um aumento na taxa de letalidade da LV, além de aumentar de 3 a 5 vezes a predisposição a recidivas da doença, em comparação aos indivíduos negativos para a infecção pelo HIV-1 (Lindoso et al, 2014). Por outro lado, o desenvolvimento da LV pode intensificar o *status* de imunossupressão apresentado pelos pacientes infectados pelo HIV-1, fazendo com que esses progridam mais rapidamente para a AIDS. Adicionalmente, o grave comprometimento imunológico na coinfeção *Leishmania*/HIV-1 pode fazer com que esses indivíduos desenvolvam, com certa frequência, manifestações clínicas incomuns e/ou disseminadas da doença para sítios atípicos, como pele, trato gastrointestinal, respiratório, cardíaco, renal, entre outros (Santos-Oliveira et al, 2011; Vyas & Shah, 2011; Celesia et al, 2014), comprometendo ainda mais o estado geral do paciente coinfectado. Por fim, a associação LV/HIV-1 se apresenta de forma peculiar não apenas clinicamente, mas também em termos de perfil de diagnóstico laboratorial, de resposta ao tratamento específico e, como mais recentemente observado, em termos do desenvolvimento da resposta imunológica.

1.2 Imunopatogênese da leishmaniose visceral (LV)

De modo geral, as leishmanioses são classificadas clinicamente em leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar americana (LTA), essa última podendo se apresentar em três formas clínicas diferentes: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea-difusa (LCD) e leishmaniose mucosa (LM). Este estudo teve como foco principal a imunopatogênese da forma visceral da doença, e da sua associação com o HIV-1.

Sendo assim, a LV caracteriza-se como uma forma sistêmica das leishmanioses, uma vez que as formas amastigotas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* (no Velho Mundo) apresentam acentuado tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, medula óssea e linfonodos. O fato do

parasito residir, primariamente, dentro de macrófagos presentes nestes órgãos faz com o curso da doença evolua com um comprometimento subjacente dos mecanismos imunológicos de defesa do hospedeiro (Cruz et al, 2006). Desse modo, um paciente com LV apresenta sinais e sintomas como febre persistente de baixo grau, caquexia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e a clássica hepatoesplenomegalia (Figura 2).



Figura 2: Manifestações clínicas da leishmaniose visceral. Pacientes com leishmaniose visceral apresentando hepatoesplenomegalia característica da doença (Brasil, 2006).

Neste contexto, a imunopatogênese da LV torna-se bastante complexa, envolvendo o comprometimento de diferentes órgãos do sistema imune e, conseqüentemente, levando a importantes alterações em outros compartimentos. A princípio, a infecção de macrófagos pela *L. infantum* acarreta em uma reposição dessa linhagem celular pela medula óssea. Em consequência, a produção de outras células como eritrócitos, plaquetas e até mesmo de progenitores de linfócitos T sofre um importante desvio, o que leva ao aparecimento de sinais característicos da doença, como anemia, hemorragias e de um grave comprometimento da resposta imune celular (Saha et al, 2006). Tal fato faz com que a LV evolua com uma intensa imunossupressão da resposta imune específica para o parasito.

Assim, a natureza supressora da resposta imune durante a LV ativa seria principalmente específica para antígenos de *Leishmania*, uma vez que testes de hipersensibilidade do tipo tardia (teste de Montenegro) para esses antígenos apresentam-se negativos (Goto & Prianti et al, 2009). Além disso, já foi descrito uma perda da capacidade proliferativa de células T e uma

deficiência na produção de citocinas, como IL-2 e IFN- γ , em resposta a estimulação *in vitro* com os antígenos do parasito (Carvalho et al, 1985, 1989). No entanto, esse prejuízo na resposta imune celular parece ser revertido após o término do tratamento específico, através da restauração da produção de IFN- γ e da capacidade linfoproliferativa. Ainda assim, os mecanismos que conduzem a imunossupressão na LV ainda são amplamente desconhecidos, embora se tenha a convicção de que antígenos de *L. infantum* sejam cruciais nesse processo.

Apesar desse grave comprometimento da resposta imune efetora na LV, o conceito de que a doença cursa com um intenso grau de ativação do sistema imune é cada vez mais consistente (Goto & Prianti, 2009; Santos-Oliveira et al, 2011). Um estudo recente sugeriu que o substrato patogênico na LV deve incluir uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada, mediada por citocinas inflamatórias, que está associada à falência múltipla dos órgãos, fazendo dessa doença algo muito similar ao que ocorre na sepse, na malária e em outras doenças inflamatórias (Costa et al, 2010; Costa et al, 2013). Além disso, tem sido descrita uma intensa ativação policlonal de células B, de modo que altos títulos de anticorpos, sejam inespecíficos ou mesmo anti-*Leishmania*, são característicos da doença ativa no soro de pacientes com LV (Galvão-Castro et al, 1984; Saha et al, 2006; Goto & Lindoso, 2009).

Apesar dos níveis elevados de citocinas do tipo 2 serem observados nos indivíduos com LV (Peruhype-Magalhães et al, 2006), um padrão misto de resposta dos perfis Th1 e Th2 tem caracterizado a fase ativa da doença (Goto & Lindoso, 2004), de modo que muitos estudos tem descrito que pacientes com LV ativa apresentam níveis significativamente elevados de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 no soro, comparados com pacientes assintomáticos ou indivíduos saudáveis (Ansari et al, 2006; Khoshdel et al, 2009, Andrade-Costa et al, 2012).

A presença de níveis elevados de IFN- γ em pacientes com LV ativa sugere que suas fontes de produção possam ser os órgãos linfoides, onde os parasitos proliferam (Goto & Prianti, 2009), podendo estar relacionada com importantes alterações fisiopatológicas encontradas durante a doença ativa. Entretanto, o aumento simultâneo dos níveis de IL-10 também na fase ativa da

doença parece mascarar a resposta pro-inflamatória do IFN- γ . Tal fato faz da IL-10 uma das principais citocinas envolvidas no estabelecimento e progressão da LV, além de ser apontada como um importante fator para a sobrevivência e persistência do parasito no interior de macrófagos (Andrade-Costa et al, 2012). Adicionalmente, tem sido descrito que existe um sinergismo entre a IL-10 e a IL-4, uma citocina que também pode agravar o cenário imunossupressor. Desse modo, altas concentrações de IL-10 e IL-4 podem inibir a expansão de células T do perfil Th1, além de promover a desativação do potencial leishmanicida de macrófagos (Carvalho et al, 1994; Andrade-Costa et al, 2012), comprometendo de forma importante os mecanismos efetores de combate ao parasito.

Além disso, essa intensa resposta inflamatória sistêmica foi recentemente associada à gravidade da LV, estando relacionada com a ocorrência de complicações fatais da doença, como a coagulação intravascular disseminada (Costa et al, 2013). Nesse estudo, foi demonstrado que maiores concentrações de citocinas como IL-6, IL-8 e IFN- γ precediam o óbito de pacientes com LV ativa, além de estarem correlacionadas com parâmetros clínicos e laboratoriais associados com a LV grave, quando aliadas aos níveis também elevados de TNF- α e IL-1 β (Costa et al, 2013). Esses resultados reforçaram a hipótese de que a letalidade da LV é, muito comumente, o reflexo de uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada, e que uma terapia anti-citocinas, por exemplo, poderia ser testada como uma terapia adjuvante para as formas mais graves da doença em modelos animais (Carvalho et al, 1994; Costa et al, 2013).

Adicionalmente, já foi descrito que indivíduos que apresentam LV autorresolutiva ou mesmo aqueles que são submetidos à quimioprofilaxia bem-sucedida, manifestam uma resposta de hipersensibilidade tardia mediada por células e, ainda, são capazes de apresentar maiores proporções de células T CD4⁺ específicas com perfil Th1 (Goto & Lindoso, 2004; Saha et al, 2006). Isso sugere que uma possível mudança para esse perfil de resposta poderia contribuir para a resolução da infecção na LV. Tal fato já foi demonstrado através da combinação de citocinas, como IL-2 e INF- γ exógenos, que parecem restaurar a resposta linfoproliferativa, da mesma forma que a combinação de anti-IL-4 e anti-IL-10 não só parece ser capaz de restaurar essa resposta, como

também a produção de IFN- γ em culturas de células de pacientes com LV (Carvalho et al, 1994).

Embora existam evidências de que os componentes do próprio parasito desempenham um papel crucial sobre a ocorrência dessas anormalidades em pacientes com LV ativa, os mecanismos precisos envolvidos nessas alterações ainda permanecem desconhecidos. Considerando que já foi evidenciada a presença de formas amastigotas em células do tecido linfoide associado à mucosa (Luz et al, 2010) e que a LV cursa com um intenso grau de ativação celular e comprometimento imunológico, cogitou-se que a translocação de produtos microbianos do lúmen intestinal para a corrente sanguínea poderia estar envolvida nesse processo crônico. De fato, assim como já foi observado em outras infecções que também cursam com um intenso grau de ativação, entre elas a infecção pelo HIV-1 (Brenchley et al, 2006), um estudo prévio do nosso grupo investigou a presença de produtos microbianos na circulação de pacientes de LV durante e após a doença ativa (Santos-Oliveira et al, 2011). Estes pacientes apresentaram níveis elevados de lipopolissacarídeo (LPS) e seu receptor, a molécula de CD14 solúvel (sCD14), em paralelo a percentuais elevados de linfócitos T ativados, definidos através da expressão de HLA-DR (Santos-Oliveira et al, 2011). Esses resultados estavam relacionados com a intensa imunossupressão desses pacientes, levantando a hipótese de que outros mecanismos, além da presença de *L. infantum*, poderiam estar associados ao grau de comprometimento imunológico desses indivíduos.

Finalmente, outros trabalhos já têm descrito uma relação entre esse *status* de ativação na LV e a conseqüente exaustão crônica do sistema imune. Essa exaustão pode ser identificada através do aumento da expressão de moléculas com atividade inibitória, como PD-1 e CTLA-4, que regulam negativamente a ativação de células T, além de consistirem em marcadores característicos de anergia/exaustão de células T durante infecções crônicas (Gautam et al, 2013). A exaustão na LV tem sido descrita em ambas as subpopulações de linfócitos T, sendo caracterizada por um prejuízo funcional caracterizado por uma diminuição na capacidade proliferativa dessas células em resposta aos antígenos de *L. infantum*, bem como na produção de citocinas, como IFN- γ , após o estímulo antigênico (Esch et al, 2013).

1.3 Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1

O HIV-1 (gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae*) é um vírus formado por um núcleo protéico contendo duas cópias idênticas de RNA de 9,2 kb, que constituem seu genoma, e por enzimas virais (transcriptase reversa, integrase e protease) que são cruciais para o processo de replicação viral. Tais componentes são envolvidos por um envelope lipoprotéico, no qual se inserem as proteínas gp120 e gp41, que desempenham papéis importantes durante a infecção das células-alvo. O HIV-1 tem como alvo as células que expressam em sua superfície a molécula CD4, como monócitos, macrófagos, células dendríticas e células microgliais do sistema nervoso central, mas principalmente os linfócitos T CD4⁺. No início do ciclo replicativo, ocorre a ligação da proteína gp120 do envelope viral à molécula de CD4 da célula-alvo. Após essa interação inicial, uma região específica da gp120, a alça V3, torna-se exposta e apta à ligação aos correceptores (receptores de citocinas), principalmente CCR5 e CXCR4. Esses correceptores permitem não só a infecção de linfócitos T CD4⁺, bem como de células centrais para a apresentação de antígenos, como macrófagos e células dendríticas. Possuindo essas células papéis fundamentais no estabelecimento de uma resposta imune adaptativa funcional, reside na alteração de seus potenciais qualitativo e quantitativo, em especial dos linfócitos T CD4⁺, o processo de imunopatogênese associada à imunossupressão da infecção pelo HIV-1.

A maioria dos indivíduos positivos para o HIV-1, na ausência da terapia antirretroviral combinada altamente potente, a TARV, leva, em média, cerca de 10 anos para apresentar os sintomas definidores de AIDS e são chamados de progressores típicos (Pantaleo & Fauci, 1996). No entanto, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesta progressão para a AIDS já se iniciam nas primeiras semanas pós-infecção.

Dessa forma, refletindo o padrão clássico apresentado por indivíduos infectados pelo HIV-1 em ausência de TARV, o curso clínico natural da infecção pelo HIV-1 é marcado por diferentes fases (Lewis, 2013), como pode ser observado na Figura 3. Uma fase inicial de aquisição, também conhecida como fase eclipse, a qual engloba eventos que seguem desde a exposição ao vírus até o aparecimento da primeira viremia (níveis de RNA plasmático),

detectável por ensaio virológico ultrasensível. Essa fase perdura por aproximadamente 10 dias, e é neste período que provavelmente, o vírus estabelece os reservatórios virais em células T CD4⁺ *resting* de memória. Além disso, nesta etapa da infecção surgem os sintomas retrovirais agudos, semelhantes àqueles presentes na mononucleose ou em outras viroses. Logo após à fase eclipse, os níveis de RNA viral aumentam exponencialmente, caracterizando uma expansão e disseminação sistêmica do vírus, acompanhados por uma queda drástica nas contagens de linfócitos T CD4⁺ circulantes. Cerca de 28 dias depois, verifica-se uma diminuição da carga viral, devido ao controle imunológico inicial e o estabelecimento de um *plateau* (*set point* viral), o qual pode durar por muitos anos. Com o controle da viremia pós-infecção, inicia-se a fase crônica da infecção pelo HIV-1, clinicamente assintomática, que permanece até que esse controle viral seja perdido e que se tenha o aparecimento das doenças definidoras de AIDS. Este período, que pode perdurar por muitos anos, é caracterizado por uma perda lenta e progressiva dos linfócitos T CD4⁺, com simultânea expansão de células T CD8⁺ ativadas, que a princípio mantêm a homeostase no número de linfócitos T totais e contínuos danos ao sistema imune. Eventualmente, o controle da replicação viral é perdido, levando novamente ao aumento da viremia, à intensificação no declínio de células T totais e comprometimento do estado geral do indivíduo infectado que, em consequência, progride para a AIDS. O aparecimento e/ou reaparecimento de infecções oportunistas, assim como da LV, é favorecido por esse quadro de imunodeficiência grave. Dessa forma, a ausência da TARV nessa fase da infecção pode culminar no óbito do indivíduo infectado.

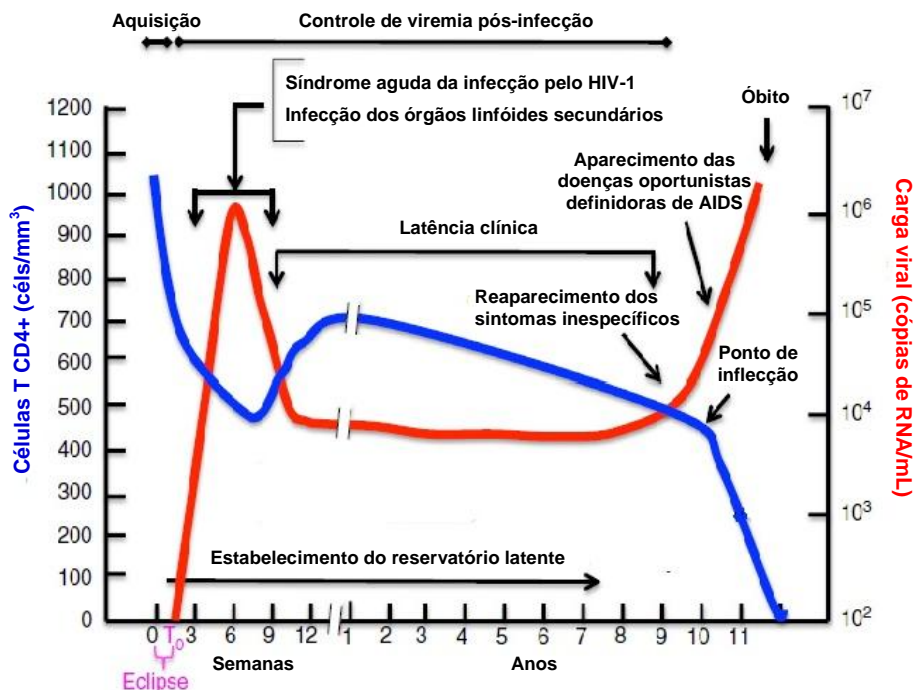


Figura 3: Curso clínico natural da infecção pelo HIV-1 na ausência de TARV. Na abscissa, o tempo 0 indica o dia de exposição ao vírus. A fase eclipse corresponde ao período que vai da infecção pelo HIV-1 (0) até a primeira viremia detectável (T_0). Modificado de Lewis, 2013.

Diante deste cenário, sabe-se que a infecção pelo HIV-1 compromete gravemente o sistema imunológico do hospedeiro, levando o indivíduo infectado a ser mais vulnerável a uma variedade de outras doenças infecciosas, e estando as leishmanioses incluídas. Isso ocorre pelo fato dos linfócitos T $CD4^+$, principais alvos da infecção, desempenharem um papel central no desenvolvimento da resposta imune específica contra o vírus. Assim, a perda progressiva no número dessas células favorece o estabelecimento desse quadro de imunodeficiência grave observada nos pacientes infectados (Douek et al, 2002). Tal fato faz com que o monitoramento das contagens absolutas de linfócitos T $CD4^+$, aliada aos níveis de carga viral, seja o principal parâmetro imunológico utilizado no acompanhamento da infecção pelo HIV-1 e da sua progressão para AIDS. Adicionalmente, esses parâmetros, em especial os níveis de células T $CD4^+$, têm sido decisivos ao longo das últimas décadas

para a indicação de submissão à TARV, bem como às profilaxias específicas para as doenças oportunistas, além de permitir a avaliação da reconstituição imune pós-tratamento nos pacientes infectados (Miller et al, 1999).

Os mecanismos precisos envolvidos na destruição progressiva dos linfócitos T CD4⁺, embora intensamente investigados, ainda não foram completamente elucidados. Já foi demonstrado em alguns trabalhos que a infecção e morte direta das células T CD4⁺ pelo vírus contribuem apenas parcialmente para essa depleção, uma vez que o HIV-1 não é um vírus lítico (Douek et al, 2002). Isso pode ser visualizado uma vez que, mesmo com a submissão à TARV e com níveis indetectáveis de carga viral, a reconstituição imunológica dos indivíduos infectados pode ser deficiente e incompleta. A partir daí, passou-se a sugerir que os efeitos sobre o sistema imune que estavam indiretamente relacionados à infecção viral também eram importantes. Dentre esses mecanismos, aponta-se o sequestro de células T para os órgãos linfoides secundários, que conduz a uma aparente perda de células T na periferia e, conseqüentemente, a mudanças no número e proporção de suas subpopulações na circulação. Além disso, outro mecanismo amplamente considerado como um dos responsáveis pela contínua depleção de células T CD4⁺ é a intensa ativação do sistema imune. O grau de ativação apresentado por indivíduos infectados pelo HIV-1 tem sido caracterizado como um preditor de progressão para AIDS, independente da depleção das células T CD4⁺, sobretudo em pacientes não tratados (McCune, 2001).

Atualmente, é amplamente aceito que esse processo de ativação está diretamente relacionado à perda progressiva de células T CD4⁺ e, conseqüentemente, à intensa imunossupressão e progressão para a AIDS (Douek, 2013). A princípio, tal ativação celular parece não diferir daquela observada em outras infecções sistêmicas, a qual reflete a montagem de uma resposta imune antiviral. Entretanto, na infecção pelo HIV-1, esse *status* de ativação persiste indefinidamente, ao passo que nas demais infecções ela declina ou é adequadamente controlada (Picker, 2006).

Esse ambiente de desorganização do sistema imune nos indivíduos infectados pode ser reconhecido através de uma variedade de alterações fenotípicas observadas para as células T, como o aumento da expressão de moléculas de superfície associadas à ativação do sistema imune (Giorgi et al,

2002; Benito et al, 2004). Essa expressão, em especial das moléculas CD38 e HLA-DR, está associada à progressão da infecção pelo HIV-1 para a AIDS, e a avaliação periódica desse fenótipo pode auxiliar no monitoramento da infecção. A molécula CD38 é uma ectoenzima multifuncional envolvida na regulação de cálcio intracelular, de modo que sua diminuição estaria relacionada com respostas imunológicas prejudicadas e distúrbios metabólicos. Em contrapartida, o aumento da expressão de CD38 na superfície celular é descrito como um indicador de ativação celular, que não está apenas ligado à infecção pelo HIV-1, mas também a neoplasias de células B, tumores sólidos e diabetes tipo 2 (Quarona et al, 2013).

Estudos têm demonstrado que a expressão de CD38 em células T CD8⁺, bem como a coexpressão CD38/HLA-DR aumenta progressivamente com o avanço da doença na infecção pelo HIV-1, e que esse aumento está associado com o declínio de células T CD4⁺ totais e aumento da carga viral plasmática (Benito et al, 2004; Sauce et al, 2013), além de aumentar em duas vezes mais o risco relativo de progressão para a doença (Karim et al, 2012). A ativação crônica não-específica, vista através da hiperexpressão desses marcadores, sobretudo em linfócitos T CD8⁺, parece também estar relacionada com um aumento na produção de citocinas pro-inflamatórias e com uma indução de alterações histológicas nos nódulos linfóides. Tal fato pode prejudicar de forma progressiva a organização funcional do sistema imune, reduzindo sua capacidade regenerativa e favorecendo a evolução viral, o que pode resultar na progressão mais rápida para AIDS (Bartovská et al, 2011).

Vários mecanismos podem contribuir para esse *status* de ativação na infecção pelo HIV-1, sejam eles direto ou indiretamente relacionados ao vírus. Dessa forma, além da própria estimulação antigênica através da replicação viral, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-6, IL-1 β e quimiocinas, como RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β já foram diretamente implicados nesse processo (Connolly et al, 2005; Vandergeeten et al, 2012; Nasi et al, 2014), consistindo em fatores indiretamente relacionados à infecção viral.

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm apontado as citocinas como importantes cofatores que regulam os mecanismos imunológicos e virológicos associados com a persistência viral e o grau de ativação na infecção pelo HIV-1

(Vandergeeten et al, 2012). Desse modo, citocinas anti-inflamatórias podem contribuir para o estabelecimento da latência viral por diminuir os níveis de ativação e a replicação do vírus, criando a condição imuno-viológica necessária para a persistência de um pool de células T CD4⁺ infectadas latentes (Stacey et al, 2009). Em contrapartida, os níveis elevados de citocinas pro-inflamatórias podem favorecer a persistência viral por contribuir para a manutenção da replicação em baixos níveis nos tecidos linfoides, mesmo após longo período de TARV (Chun et al, 1998). Dessa forma, enquanto a inibição da replicação consiste em um pré-requisito para o estabelecimento de latência, os efeitos opostos podem contribuir para persistência do vírus por promover a replicação viral contínua em baixos níveis nos reservatórios anatômicos do HIV-1.

Adicionalmente, a passagem de produtos microbianos de origem luminal para a circulação também é considerada um mecanismo central para a patogênese da infecção pelo HIV-1 (Brenchley et al, 2006; Klatt et al, 2013), e para o grau de ativação do sistema imune. De fato, durante a fase aguda da infecção pelo HIV-1 em humanos, e pelo SIV (vírus da imunodeficiência símia) em macacos *Rhesus*, tem sido demonstrado que o trato gastrointestinal é particularmente afetado pela própria replicação viral e pela intensa ativação do sistema imune (Brenchley et al, 2006). Isso se dá pelo fato de que, logo na fase aguda inicial da infecção, ocorre uma destruição massiva de células T CD4⁺CCR5⁺ de memória presentes na mucosa intestinal, como resultado direto da infecção pelo vírus, mas que se mantém de forma constante durante todo o curso da doença (Brenchley & Douek, 2008). Devido a essa depleção das células T CD4⁺ no trato gastrointestinal, e a outros danos observados no tecido linfóide associado à mucosa (Brenchley & Douek, 2008), a translocação microbiana vem sendo considerada um importante mecanismo imunopatogênico que contribui para esse processo de ativação imune (Douek, 2007). Desse modo, microorganismos, sobretudo bactérias gram-negativas presentes no lúmen intestinal, e produtos microbianos derivados das mesmas seriam translocados para a circulação sistêmica. Tal fenômeno pode ser identificado por um aumento dos níveis plasmáticos de LPS nos indivíduos infectados pelo HIV-1 (Brenchley et al, 2006). Esses componentes bacterianos podem estimular as células da imunidade inata por meio dos seus ligantes de

receptores tipo-Toll (Gioannini et al, 2007). O LPS, por exemplo, liga-se ao seu receptor CD14 solúvel ou de membrana e, por sua vez, ao complexo TLR4-MD2, o qual culmina com a ativação do fator transcricional NF-KB e com a produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 β , TNF e IFN do tipo I. Estas contribuirão para a persistente ativação imune observada durante a fase crônica da infecção pelo HIV-1 (Miller et al, 2005, Gioannini et al, 2007).

De fato, níveis aumentados de LPS foram observados em pacientes infectados pelo HIV-1 na fase crônica comparados aos indivíduos sadios e àqueles na fase aguda da doença. Estes níveis de LPS foram associados aos níveis de sCD14, aos níveis plasmáticos da citocina pró-inflamatória IFN- α e ao percentual de linfócitos T com fenótipo ativado (Brenchley et al, 2006). Mais recentemente, verificou-se que os níveis de sCD14 podem prever a mortalidade em pacientes infectados pelo HIV-1 sob TARV, independente das contagens de T CD4⁺ e da carga viral (Sandler et al, 2011). Além disso, a quantificação do DNA ribossomal 16S de bactéria também vem sendo utilizada como um importante indicador de translocação microbiana e de ativação imune sistêmica (Jiang et al, 2009).

Em adição à progressiva depleção e disfunção de células T, a infecção pelo HIV-1 também cursa com um extenso comprometimento no braço humoral do sistema imune. Dessa forma, a infecção pelo vírus tem sido associada a numerosos aspectos que caracterizam a disfunção do compartimento imune de células B. Essas características incluem o aumento da expressão de marcadores de ativação (CD70, CD71, CD80 e CD86), hipergamaglobulinemia e intensa ativação policlonal de células B (Siewe & Landay, 2012), bem como perturbações em diversos subtipos de linfócitos B (Moir & Fauci, 2009) e secreção de citocinas pró-inflamatórias (Siewe & Landay, 2012).

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

2009), o que reflete mais uma vez esse *status* cronicamente ativado da infecção pelo HIV.

Não como uma causa, mas como uma consequência dos sucessivos momentos de ativação celular ao longo da vida, verifica-se com o envelhecimento, um processo natural do organismo, a deterioração da competência imune. Esse processo explica, em parte, a morbi-mortalidade aumentada em indivíduos idosos imunocompetentes, não acometidos por imunodeficiências de qualquer natureza. Por analogia, o intenso grau de ativação imune observado na infecção pelo HIV-1 vem sendo considerado um possível fator acelerador do envelhecimento do sistema imunológico, fazendo com que indivíduos infectados exibam de forma mais grave e antecipada, características imunológicas apresentadas apenas por adultos em idades mais avançadas. Este processo denomina-se imunosenescência e pode se manifestar de maneira clonal e/ou global (Appay et al, 2007).

A ativação imune crônica e o processo de inflamação vêm sendo cada vez mais associados, não apenas à depleção de células T CD4⁺, mas também a esse envelhecimento sistêmico, que resulta na deterioração de diversas funções fisiológicas em indivíduos infectados pelo HIV-1, bem como em idosos imunocompetentes (Appay & Sauce, 2008). Em resposta a diversas infecções e danos teciduais, citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-1 β e IL-6, são produzidas e secretadas, constituindo-se em uma complexa cascata inicial de destruição de patógenos e reparo tecidual, que atua como uma resposta natural do organismo a essas situações de estresse. No entanto, na infecção pelo HIV-1 ocorre a produção e/ou o acúmulo excessivo desses mediadores, o que acarreta em um grave comprometimento imunológico. Tais fatores também podem ser encontrados em altas concentrações no sangue de idosos, desempenhando um papel crucial no processo de envelhecimento, uma vez que estão associados ao aparecimento de diversas doenças relacionadas ao avanço da idade. Esse processo é conhecido como um envelhecimento inflamatório, sendo caracterizado pela hiperregulação de respostas anti-estresse e produção de citocinas pró-inflamatórias (“inflammaging”). O envelhecimento inflamatório, aliado ao processo de imunosenescência, tem sido descrito por agravar o grau de imunodeficiência na infecção pelo HIV-1 (Appay & Sauce, 2008; Deeks, 2013).

Adicionalmente, a ativação crônica do sistema imune observada na infecção pelo HIV-1 vem sendo descrita como uma das principais causas da proliferação celular acelerada, expansão e morte de células T, inclusive de células específicas ao vírus (Grossman et al, 2006). Embora seja constantemente debatida a dinâmica do *turnover* de células T, o consenso geral é que o tempo de vida de ambas as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ diminui em aproximadamente três vezes em indivíduos positivos para o HIV-1, quando comparados àqueles não infectados pelo vírus (Appay & Rowland-Jones, 2002). Dessa forma, apesar da intensa proliferação mediante ao processo de ativação celular, o tempo de vida limitado das populações de linfócitos T conduz, de forma precoce, a um estado de senescência replicativa na infecção pelo HIV-1, que está diretamente relacionado ao número de divisões celulares. Esse fenômeno caracteriza-se pela presença de inúmeros clones de células T CD4⁺ e T CD8⁺ terminalmente diferenciados, reconhecidos pelo fenótipo CD27⁻CD28⁻ (Papagno et al, 2004). Essas subpopulações tendem a perder a capacidade de secretar citocinas, como IL-2 e IFN- γ , apresentam menor diversidade em seu repertório de receptores celulares (TCR) e maior suscetibilidade à morte induzida por ativação (Appay et al, 2007). Neste cenário, o indivíduo pode perder o controle da resposta imune ao vírus, ou ainda, progredir mais rapidamente para a AIDS (Nasi et al, 2014).

Além disso, o processo de senescência replicativa também pode ser identificado através da expressão da molécula CD57 na superfície das células T (Brenchley et al, 2003, Chou & Effros, 2013), bem como através da perda da capacidade replicativa das células *in vitro* frente a mitógenos (Brenchley et al, 2003; Sauce et al, 2013). Além disso, o comprimento do telômero da subpopulação de linfócitos T CD8⁺ é significativamente encurtado em pacientes infectados pelo HIV-1 (Appay & Rowland-Jones, 2002), o que também deve contribuir com uma diminuição da capacidade proliferativa dessas células.

A princípio, o sistema imune deveria ser capaz de substituir esse *pool* celular altamente diferenciado, bem como de compensar a perda de células T CD4⁺ depletadas, liberando para a periferia um repertório celular com novas e diferentes especificidades. Entretanto, outra importante consequência desse processo de ativação é a exaustão dos recursos imunes primários (Appay & Sauce, 2008). De forma subjacente a esse processo, a produção de células T

CD4⁺ *naïve* não é mais suficiente para compensar a destruição destas células pela infecção, o que pode ser resultado de uma disfunção a nível tímico (Douek et al, 1998; Molina-Pinelo et al, 2009), conduzindo a uma diminuição da geração de novas células T para a periferia. Por outro lado, observa-se um aumento modesto na saída de linfócitos T CD8⁺ para periferia (Appay & Rowland-Jones, 2002), que resulta na baixa razão de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺, característica de indivíduos infectados (Serrano-Villar et al, 2014). No entanto, acredita-se que a maioria dessas células T CD8⁺ corresponda a clones com fenótipo de células terminalmente diferenciadas.

É importante ressaltar que a TARV, um dos maiores avanços na medicina moderna, não é capaz de restaurar totalmente a saúde dos indivíduos infectados, uma vez que esses persistem com o grau de ativação imune e continuam apresentando risco elevado de morbidade e mortalidade quando comparados à população geral. Nesse contexto, um risco aumentado da ocorrência de um novo conjunto de complicações, denominadas eventos não-AIDS, emergiu em indivíduos infectados pelo HIV-1 sob uso prolongado da TARV e transformou essa infecção em uma doença crônica. Estas complicações não-AIDS incluem as doenças cardiovasculares, malignidades não-AIDS, falha renal, falha hepática, osteopenia ou osteoporose e desordens neurocognitivas. Os exatos mecanismos responsáveis por esse risco aumentado de eventos não-AIDS estão longe de serem completamente esclarecidos, mas acredita-se que tais complicações também possam estar associadas à ativação aumentada do sistema imune e à inflamação (Desai e Landay, 2010).

Como pode ser observado até o momento, pacientes infectados pelo HIV-1 vivenciam um círculo vicioso, que vai desde a baixa reconstituição imune, até o intenso grau de ativação celular e *status* inflamatório, alcançando o fenômeno de imunosenescência. Juntos, esses fatores irão comprometer de forma importante a resposta imune efetora destes pacientes, fazendo-os mais suscetíveis ao surgimento de outras doenças infecciosas, dentre elas a LV. Tal associação pode, por sua vez, agravar o comprometimento imunológico desses pacientes, acelerando ainda mais o processo de ativação celular e o envelhecimento da população de células T.

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

Diante de tudo que já foi descrito, no que se refere à imunopatogenia da LV e da infecção pelo HIV-1 especula-se que os distúrbios imunológicos causados por ambas as enfermidades podem afetar de modo recíproco os pacientes coinfectados. Além disso, a intensa ativação crônica do sistema imune aliada à resposta pró-inflamatória pode apresentar-se de forma potencializada na associação LV/HIV-1, agravando a condição clínica dos pacientes coinfectados.

A imunopatogênese das infecções causadas pelo HIV-1 e pela *Leishmania infantum* é profundamente dependente da resposta imune específica. Desse modo, em um cenário de coinfecção *Leishmania*/HIV, a desregulação do sistema imunológico e a depleção do repertório de linfócitos T específicos, provocados pelo HIV-1, comprometem os mecanismos de controle da replicação do parasito, contribuindo, assim, para a progressão da leishmaniose. Esse fato pode explicar a explosão de casos de recidivas da doença, observada em áreas com uma alta prevalência dessa associação (Cota et al, 2011).

A introdução da TARV tem reduzido a incidência de infecções oportunistas, bem como das leishmanioses, em pacientes de HIV-1/AIDS, por permitir uma melhora imunológica nesses indivíduos (Demarchi et al, 2012). Estudos recentes têm demonstrado que os antirretrovirais da classe de inibidores de protease (IPs) apresentam efeitos inibitórios sobre formas evolutivas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, impedindo a replicação das formas promastigotas e a proliferação das amastigotas no interior dos macrófagos, bem como o desenvolvimento de lesão em camundongos infectados (Demarchi et al, 2012). De forma interessante, esses efeitos inibitórios dos IPs também já foram observados *in vitro* sobre as formas evolutivas de *L. infantum*, porém apenas quando essas eram isoladas de pacientes que não faziam uso da TARV. Em outras palavras, quando a cepa de *L. infantum* era isolada de pacientes coinfectados submetidos à TARV, nenhum efeito inibitório dos IPs pode ser observado sobre as formas evolutivas do parasito (Santos et al, 2013).

Apesar dessas ações da TARV sobre a diminuição da incidência de LV por *L. infantum* já terem sido bem evidenciadas, a terapia parece não ser capaz de prevenir as frequentes reativações, principalmente da forma visceral da doença (Casado et al, 2001; Alvar et al, 2008). Essa ocorrência de reativações da LV, mesmo na presença da TARV e carga viral indetectável, tem contribuído para a hipótese de que a manutenção do tratamento anti-*Leishmania*, através da profilaxia secundária, poderia ser eficaz em diminuir a média de recidivas da doença nesses pacientes LV/HIV-1 (Cota et al, 2011). Dessa forma, após tratar a fase ativa da LV com o tratamento anti-*Leishmania* específico, mantêm-se esses pacientes em vigência do tratamento em um regime profilático, a fim de se evitar novos episódios ativos da doença. Segundo as recomendações do Ministério da Saúde, a profilaxia secundária deve ser administrada quando o paciente LV/HIV-1 atinge contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ inferiores a 350 células/mm³, sendo comumente adotado o esquema profilático com anfotericina B, na dose de 1 mg/Kg, a cada duas semanas.

A presença concomitante de ambos os patógenos dentro de uma mesma célula hospedeira foi evidenciada antes mesmo do primeiro caso de coinfeção *Leishmania*/HIV-1 ter sido relatado. O fato desses patógenos infectarem as mesmas células-alvo, e desse modo, comprometerem os mesmos compartimentos imunes, conduziu a hipótese de que ambas infecções poderiam exercer efeitos sinérgicos prejudiciais sobre a resposta imune efetora e, conseqüentemente, sobre o controle de cada um dos patógenos (Alvar et al, 2008). De fato, estudos realizados *in vitro* demonstraram que a infecção pelo HIV-1 induz o aumento da replicação de *L. infantum* em macrófagos (Zhao et al, 2004; Barreto-de-Souza et al, 2006). Além disso, a infecção pelo HIV-1 também é capaz de alterar a resposta específica de linfócitos T e a produção de IFN- γ frente aos antígenos de *L. infantum* (Da-Cruz et al, 1992, 2006), o que pode favorecer a disseminação do parasito para sítios atípicos de replicação naqueles indivíduos infectados pelo vírus (Santos-Oliveira et al, 2011; Vyas & Shah, 2011).

Por outro lado, é bem descrito que a infecção por *Leishmania sp*, quando ocorrida concomitantemente à infecção pelo HIV-1, induz um aumento da replicação viral (Zhao et al, 2004), acelerando a progressão para a AIDS. Esse aumento da carga viral pode ocorrer tanto *in vivo*, nos indivíduos

coinfectados, como em culturas *in vitro* (Preiser et al, 1996, Zhao et al, 2004). Um dos mecanismos propostos para esse achado é a presença de uma importante molécula da superfície do parasito, o lipofosfoglicano (LPG). O LPG aumenta a transcrição viral em células mononucleares de sangue periférico, *in vitro*, tendo como principal mecanismo a participação do fator de transcrição NF- κ B (Bernier et al, 1998). Esse fator conduz ao aumento da produção de TNF, previamente relacionada ao aumento da expressão de HIV-1 em células T e monócitos (Mellors et al, 1991). Além disso, já foi descrito que a presença de formas amastigotas de *L. infantum* em coculturas de células dendríticas humanas e linfócitos T CD4⁺ autólogos é capaz de promover o aumento da replicação viral, provavelmente devido à secreção de fatores solúveis pelas células dendríticas, como IL-6 e TNF, induzidos pelo parasito (Garg et al, 2009).

Em adição, tem sido observado que pacientes coinfectados pelo HIV-1 apresentam um agravamento da depleção de linfócitos T CD4⁺, muito provavelmente em decorrência da LV (Sinha et al, 2006). Desse modo, pacientes LV/HIV-1 apresentam contagens absolutas de T CD4⁺ inferiores àquelas observadas em pacientes mono infectados pelo HIV-1 (Santos-Oliveira et al, 2010). Esses pacientes parecem não conseguir recuperar tais contagens mesmo após o tratamento específico para *Leishmania* e sob uso da TARV por um período de até 12 meses (Alexandrino-de-Oliveira et al, 2010).

A ativação imune crônica é uma das principais características da infecção pelo HIV-1 e pela *L. infantum*, mesmo na presença de uma grave imunossupressão. Dessa forma, em um cenário de associação LV/HIV-1, o grau de ativação imune aliada à intensa resposta pró-inflamatória pode não só se apresentar de forma potencializada, como também pode se constituir em um importante cofator para o prejuízo da reconstituição imunológica observado em pacientes coinfectados e, portanto, para as frequentes recidivas da LV.

Um estudo anterior do nosso grupo avaliou de forma transversal uma casuística de pacientes LV/HIV-1 nas fases ativa e de remissão clínica da doença. Tais pacientes apresentaram baixas contagens de linfócitos T CD4⁺, independentemente do uso da TARV, de uma carga viral indetectável e da remissão clínica da LV pelo tratamento anti-*Leishmania*. Aliado a esse resultado, percentuais elevados de células T CD8⁺ expressando a molécula

CD38 foram observados, quando comparados, por exemplo, a pacientes coinfectados, com a forma tegumentar da doença (Santos-Oliveira et al, 2010).

Mais recentemente, também de forma transversal, e independente desses fatores já mencionados, esse *status* de ativação celular se manteve elevado mesmo naqueles pacientes LV/HIV-1 em remissão clínica da doença, que apresentavam carga parasitária baixa ou indetectável, aliada ao controle viral (Santos-Oliveira et al, 2013). Esses resultados levantaram a hipótese de que a infecção por *Leishmania infantum* não pode ser atribuída como o único cofator responsável pelo estado geral de ativação imune em indivíduos infectados pelo HIV-1. Nesse cenário, a translocação microbiana do lúmen intestinal para a corrente sanguínea poderia se constituir como outro importante cofator para a presença de um alto grau de ativação em pacientes LV/HIV-1 que se encontravam em remissão clínica da LV e com um controle periférico das replicações viral e parasitária. De fato, altos níveis de LPS, bem como do seu receptor sCD14 na superfície de monócitos e macrófagos, também puderam ser observados nos pacientes LV/HIV-1 dessa casuística transversal avaliada (Santos-Oliveira et al, 2013), apontando a possibilidade da translocação microbiana como um mecanismo adicional para explicar as reativações da LV nestes pacientes.

Os resultados acima descritos foram observados em pacientes acompanhados transversalmente. Acredita-se que o acompanhamento prospectivo de pacientes LV/HIV-1 desde a fase ativa da doença até longos períodos após o tratamento é indispensável para investigar se tais moléculas associadas à ativação poderão se constituir em parâmetros imunológicos para avaliação do prognóstico e grau de comprometimento imune de pacientes coinfectados. A influência do grau de ativação imune como possível preditor de evolução clínica na coinfecção já foi previamente observada em um paciente LV/HIV-1, avaliado clínico-laboratorialmente por longo tempo, que apresentou um episódio atípico de reativação cutânea da LV. Este paciente apresentou altos níveis de ativação celular não só durante a fase ativa da LV, como também no momento das recidivas da doença (Santos-Oliveira et al, 2011). Esse resultado apontou, mais uma vez, o envolvimento desse processo de ativação celular no comprometimento do controle parasitário em longo prazo, em pacientes infectados pelo HIV-1.

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

Por fim, os mecanismos pelos quais esse intenso grau de ativação pode atuar sobre os diferentes desfechos clínicos da LV (recidiva ou manutenção da remissão clínica) em pacientes LV/HIV-1 ainda são pouco elucidados. No entanto, sabe-se que a manutenção do controle parasitário depende de uma resposta imune direcionada e, sobretudo, funcional. Desta forma, o acúmulo de células terminalmente diferenciadas e o subsequente comprometimento imunológico decorrente do processo de imunosenescência podem se constituir em outro mecanismo adicional que predispõe os pacientes coinfectados pelo HIV-1, às recidivas da LV.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o fenômeno de ativação celular e o seu impacto sobre o comprometimento imunológico, em pacientes concomitantemente infectados por *Leishmania infantum* e o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1), bem como determinar sua influência no prognóstico pós-tratamento anti-*Leishmania* dos pacientes coinfectados.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar prospectivamente o grau de reconstituição imunológica, bem como parâmetros virológicos e parasitológicos dos pacientes coinfectados sob uso de TARV e pós-tratamento anti-*Leishmania*, com vistas a definir o quanto o comprometimento da resposta imune específica pode interferir no curso evolutivo da leishmaniose;
- Analisar as características fenotípicas de linfócitos T quanto à expressão de moléculas relacionadas à ativação celular, no intuito de entender se este fenômeno pode influenciar nos episódios de reativação ou controle da leishmaniose visceral;
- Avaliar se o fenômeno de imunosenescência ocorre na coinfecção *Leishmania*/HIV-1 e qual o seu impacto imunológico sobre o curso clínico do agravo;
- Avaliar fatores solúveis associados ao fenômeno da translocação microbiana, no intuito de entender se estes podem ser utilizados como parâmetros laboratoriais para o prognóstico e grau de comprometimento imune dos pacientes acompanhados;
- Avaliar os níveis de Imunoglobulinas da classe IgG anti-*Leishmania* e suas subclasses IgG1 e IgG3, a fim de inferir o grau de ativação dos linfócitos B e sua influência sobre os diferentes desfechos clínicos da leishmaniose visceral em pacientes LV/HIV-1;
- Avaliar a influencia do uso da profilaxia secundária sobre o *status* de ativação imune e, conseqüentemente, sobre a ocorrência de recidivas da LV.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística, Considerações Éticas e Aspectos Clínicos

Esse estudo investigou uma coorte com 18 pacientes coinfetados *Leishmania*/HIV-1, os quais foram avaliados prospectivamente de fevereiro de 2011 a agosto de 2013. Os pacientes LV/HIV-1 foram provenientes do Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz/MG) e do Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, Minas Gerais. Paralelamente, indivíduos sadios para ambas as infecções, provenientes do Rio de Janeiro, foram incluídos no estudo (n=20).

Os pacientes e os voluntários que aceitaram participar deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, regido de acordo com as normas da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, MS (ANEXO A). Este projeto está vinculado ao protocolo “Desenvolvimento de instrumentos clínicos e laboratoriais aplicáveis aos estudos clínico-epidemiológicos, ao diagnóstico e ao monitoramento terapêutico da coinfeção *Leishmania*/HIV”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da FIOCRUZ (protocolo nº 290/05) e do IPEC (protocolo- 0045.0.011.009-07) (ANEXO B). O mesmo também foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética do Centro de Pesquisas René Rachou- Fiocruz, Minas Gerais (CPqRR 33/2010) e do Hospital Eduardo de Menezes de Belo Horizonte (CEP/HEM) (ANEXO B).

Os pacientes receberam o tratamento específico preconizado pelo Ministério da Saúde e tiveram seu acompanhamento garantido (MS/PN-DST/AIDS, 2011). A primeira linha de tratamento da LV para pacientes infectados pelo HIV-1 foi a anfotericina B deoxicolato intravenosa durante, no mínimo, três semanas. A anfotericina B lipossomal (20 mg/Kg) foi reservada para aqueles pacientes com idade superior a 50 anos ou os que sofriam de falência renal, de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde. Após o tratamento da LV, todos os pacientes que apresentavam contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ inferiores a 350 células/mm³ foram submetidos à profilaxia secundária com anfotericina B, quinzenalmente.

No que se refere ao diagnóstico da leishmaniose visceral, este foi confirmado em todos os pacientes pelo exame parasitológico de aspirado de medula óssea, através da pesquisa direta de amastigotas de *Leishmania infantum* e cultura em meio NNN. O diagnóstico inicial da infecção pelo HIV-1 foi confirmatório quando os pacientes apresentaram os exames sorológicos ELISA e Western Blot positivos, conforme protocolo do Ministério da Saúde.

Os pacientes infectados pelo HIV-1, com sintomas clínicos e confirmação parasitológica de LV ativa, foram incluídos no estudo apenas depois das considerações éticas serem aplicadas. O estudo foi de caráter longitudinal, sendo incluídos pacientes LV/HIV-1 que apresentavam LV ativa, com ou sem uso prévio de TARV. Os pacientes com LV ativa (visita 1) foram avaliados clínico-laboratorialmente e acompanhados no pós-tratamento anti-*Leishmania* (visita 2) e a cada dois meses ao longo da fase de remissão clínica, até completarem 12 meses de acompanhamento, totalizando-se oito visitas ambulatoriais. Para as investigações imunológicas propostas neste estudo foram considerados os quatro principais momentos ao longo do acompanhamento: a fase ativa (visita 1), a fase pós-tratamento (pós-tto; visita 2), seis meses pós-tratamento (6 mpt; visita 5) e 12 meses pós-tratamento (12 mpt; visita 8).

No decorrer do estudo, a suspeita dos episódios de recidivas da LV baseou-se na presença de um dos seguintes critérios: a) reemergência de episódios febris, ou b) agravamento da citopenia (redução de 50% ou mais das contagens de plaquetas ou leucócitos; diminuição de 2g% ou mais dos níveis de hemoglobina), ou c) aumento da esplenomegalia; e os episódios foram confirmados através de um teste parasitológico positivo (exame direto ou cultura) em espécime obtido pelo aspirado de medula óssea.

Finalmente, os pacientes LV/HIV-1 foram separados em dois grupos distintos, conforme a evolução das suas características clínicas no que se refere à recidiva e não recidiva da LV. Os pacientes coinfetados não-recidivantes (NR; n=6) foram aqueles que não apresentaram nenhum episódio de LV durante todo o período de acompanhamento, e que tiveram um único episódio ativo de LV ao longo da vida. Por outro lado, os pacientes coinfetados recidivantes (R; n=12) foram aqueles que apresentaram mais de

um episódio ativo da doença, seja antes ou durante o acompanhamento prospectivo.

3.2 Obtenção de material biológico para ensaios laboratoriais

No momento da admissão no protocolo de estudo foram coletados 45 mL de sangue periférico de cada paciente, subdivididos da seguinte forma: três tubos com heparina (10 mL cada), um tubo sem anticoagulante (5 mL) e dois tubos com EDTA (5 mL cada). A coleta foi repetida a cada visita do paciente ou em algum momento em que tenha ocorrido mudança no curso clínico da infecção, isto é, quando ocorreram episódios de recidiva da LV. O soro e o plasma obtidos foram alíquotados e estocados a -70°C para serem utilizados posteriormente em outros ensaios experimentais. Os plasmas provenientes de tubos com EDTA foram utilizados para a quantificação da carga viral do HIV-1. Já o sangue conservado em EDTA foi utilizado para a obtenção das contagens absolutas de linfócitos T CD4^+ /T CD8^+ .

A partir do sangue heparinizado foram obtidas células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) para criopreservação e armazenamento em nitrogênio líquido. Posteriormente, as células foram descongeladas e utilizadas para caracterização fenotípica quanto ao grau de ativação, diferenciação celular e imunosenescência. As células restantes dos pacientes LV/HIV-1 encontram-se congeladas para os futuros ensaios de estimulação *in vitro* frente a estímulos antigênicos de *L. infantum* e do HIV-1. O plasma heparinizado, por sua vez, foi alíquotado e estocado a -70°C , e posteriormente, as alíquotas serão utilizadas nos ensaios colorimétricos e imunoenzimáticos.

3.3 Monitoramento imunológico e virológico da infecção pelo HIV-1

O monitoramento da infecção pelo HIV-1 é feito através das contagens de linfócitos T CD4^+ e T CD8^+ do sangue periférico e da quantificação da carga viral plasmática do HIV-1. Para os indivíduos LV/HIV-1, estes exames foram realizados no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do IOC, o qual faz

parte da Rede Nacional de Laboratórios de CD4⁺/CD8⁺ e de Carga Viral do Ministério da Saúde.

As contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foram realizadas a partir de 50 µL de sangue total, utilizando-se o sistema de tubos com *beads* ou bilhas de referência BD TruCount® (Becton-Dickinson – BD Franklin Lakes, NJ, EUA), e um painel de anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺, marcados com peridina-clorofila (PercP), fluoresceína (FITC), alofocianina (APC) e ficoeritrina (PE), respectivamente (BD Multitest®, BD Biosciences). As amostras foram avaliadas por citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento FACSCalibur® (BD Biosciences) e um software apropriado para esta análise (Multiset®, BD Biosciences). Os resultados foram expressos em número de células por milímetro cúbico (células/mm³).

A quantificação do número de cópias de RNA viral foi realizada a partir do plasma de todos os pacientes LV/HIV-1, através da tecnologia de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), utilizando-se o sistema RealTime HIV-1 (Abbott, Des Plaines, IL, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O intervalo de detecção variou entre 40 a 10.000.000 de cópias de RNA/mL de plasma. As amostras que apresentaram resultados abaixo de 40 cópias de RNA/mL foram identificadas como indetectáveis ou abaixo do limite de detecção.

3.4 Quantificação da carga parasitária

O DNA total do sangue periférico dos pacientes foi extraído com o kit QIAamp DNA Blood mini-kit (Qiagen GmbH; Hilden, Germany). Foram realizados dois ensaios independentes para detecção e quantificação do DNA de *Leishmania spp.* e de DNA humano no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para a quantificação do DNA de *Leishmania* foi utilizado o alvo 16S (SSU rRNA), gene conservado entre as espécies de *Leishmania*. Foram utilizados os *primers* LEIS.U1 (5'-AAGTGCTTTCCCATCGCAACT-3') e LEIS.L1 (5'-GACGCACTAAACCCCTCCAA-3'), desenhados para amplificar um fragmento

de 67 pares de base (pb), e a sonda fluorescente LEIS.P1 (FAM 5'-CGGTTCGGTGTGTGGCGCC-3'TAMRA), conforme descrito por Wortmann et al. (2002). O protocolo descrito por Gomes e colaboradores (2012) foi aplicado. Para a quantificação do DNA humano foi utilizado o alvo *ACTB* como gene de referência e os *primers* Aco1 e Aco2 (Musso et al, 1996), que amplificam um segmento de 120 pb. Cada poço da reação foi preparado com 12,5 µL de Syber® Green PCR Master Mix 2X (Life Technologies), 0,1 µM de cada primer, e 3,0 µL do DNA extraído, em um volume final de 25 µL. Foi utilizado um ciclo universal da PCR, e a curva de dissociação foi analisada com base nos parâmetros do StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Curvas padrão foram preparadas em cada ensaio usando quantidades conhecidas do vetor pCR-4 TOPO (Life Technologies) contendo a sequência do gene humano (*ACTB*; 120 pb) e o fragmento SSU rRNA de *L. infantum* (67 pb), em diluição seriada de 1:10. Os parâmetros das curvas padrão, incluindo a eficiência da PCR, linearidade e coeficiente de correlação, foram obtidos pelo software de análise e mostraram acurácia e similaridade aos estudos previamente descritos (Gomes et al, 2012; Dos Santos Marques et al, 2012). A carga parasitária foi expressa por DNA de *Leishmania* (número de cópias relativas do fragmento de 67 pb do SSU rRNA) normalizado pelo gene de referência *ACTB*, de acordo com Overbergh e colaboradores (1999). O número de cópias do alvo *ACTB* nas amostras foi dividido pelo maior valor de *ACTB* obtido no experimento, resultando em um fator de correção utilizado como normalizador.

3.5 Isolamento e caracterização fenotípica das células mononucleares de sangue periférico

As PBMCs foram isoladas por centrifugação através de gradiente em Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA) e criopreservadas em solução contendo 90% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de DMSO. Posteriormente, essas células foram descongeladas e utilizadas para os ensaios de imunofenotipagem. O painel de marcação fenotípica *ex vivo* com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos permitiu a avaliação dos seguintes parâmetros imunológicos: A) subpopulações linfocitárias: CD4⁺ e

CD8⁺ (anticorpos anti-CD4 PerCP e anti-CD8 APC); B) ativação celular: CD38⁺ e HLA-DR⁺ (anticorpos anti-CD38 PE e anti-HLA-DR PercP); D) senescência replicativa: CD57⁺ e CD27⁻ (anticorpos anti-CD57 FITC e anti-CD27 PE). Todos os anticorpos monoclonais utilizados na investigação destes parâmetros imunológicos são da BD Biosciences PharmingenTM, Califórnia, EUA. A aquisição das amostras foi realizada no equipamento FACSCalibur® (BD Biosciences), e a análise dos resultados foi conduzida com o *software* BD Cell Quest ProTM (BD Biosciences). Para cada amostra foram adquiridos 20.000 eventos dentro da região de linfócitos totais, definida de acordo com o tamanho e a granularidade das células.

As Figuras 4 e 5 apresentam, respectivamente, as sequências de passos envolvidos na definição das populações celulares ativadas ou em senescência replicativa, de uma amostra controle. A partir da região de linfócitos totais, previamente definida, foi determinada a população de linfócitos T CD3⁺, baseada no gráfico de *dotplot* de granularidade *versus* fluorescência. A avaliação dos percentuais de células que expressavam determinada molécula de superfície foi realizada tendo como universo as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺, ambas em função da região de linfócitos T CD3⁺. A coexpressão das moléculas HLA-DR e de CD38 foi analisada no contexto dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, para a caracterização dos níveis de ativação celular, como pode ser observado na Figura 4. Do mesmo modo, a expressão da molécula CD57 e a ausência da molécula CD27 na superfície celular determinaram os percentuais de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ senescentes (Figura 5).

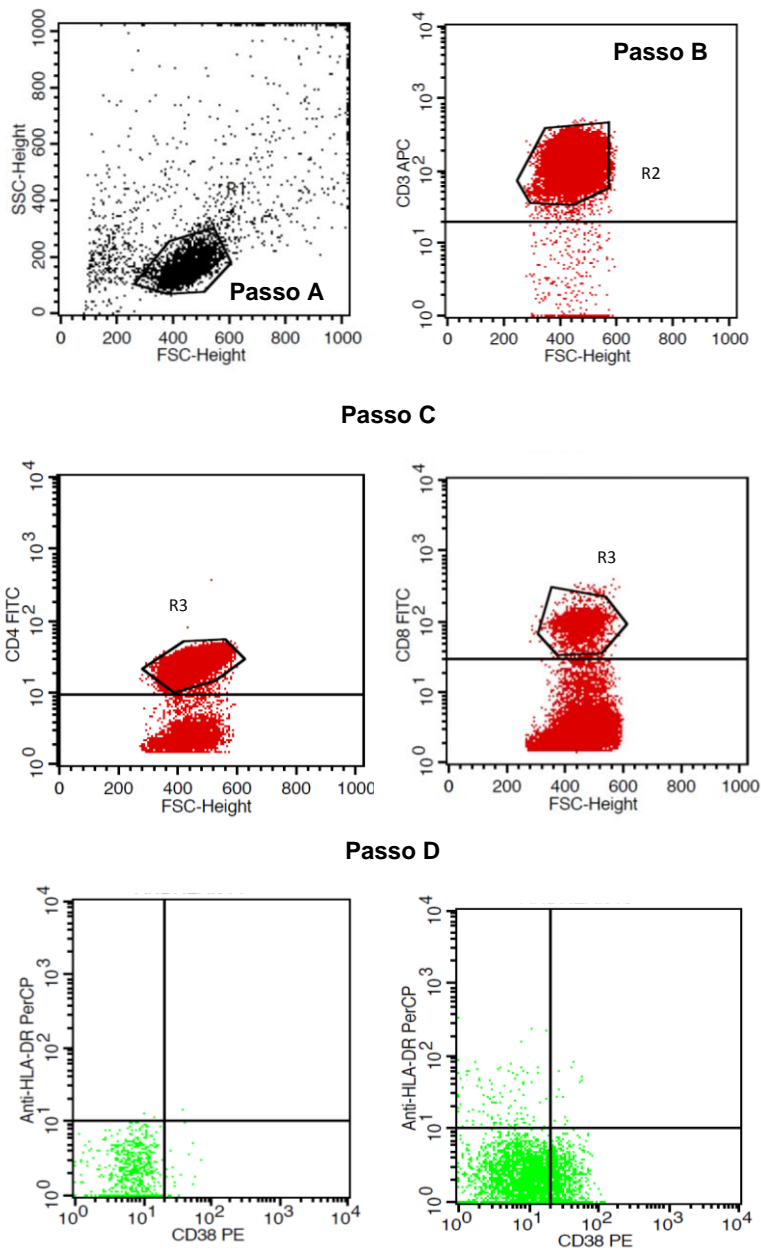


Figura 4: Modelo de análise da coexpressão fenotípica dos marcadores de ativação celular HLA-DR e CD38. A partir da região delimitada de linfócitos totais (R1 – Passo A) define-se a população de linfócitos T CD3⁺ (R2 – Passo B), e em função destas, as subpopulações linfocitárias T CD4⁺ e T CD8⁺ (R3 – Passo C). Os percentuais dessas células coexpressando as moléculas CD38 e HLA-DR são obtidos a partir da análise dos *dotplots* (Passo D). Perfil representativo de um indivíduo saudável.

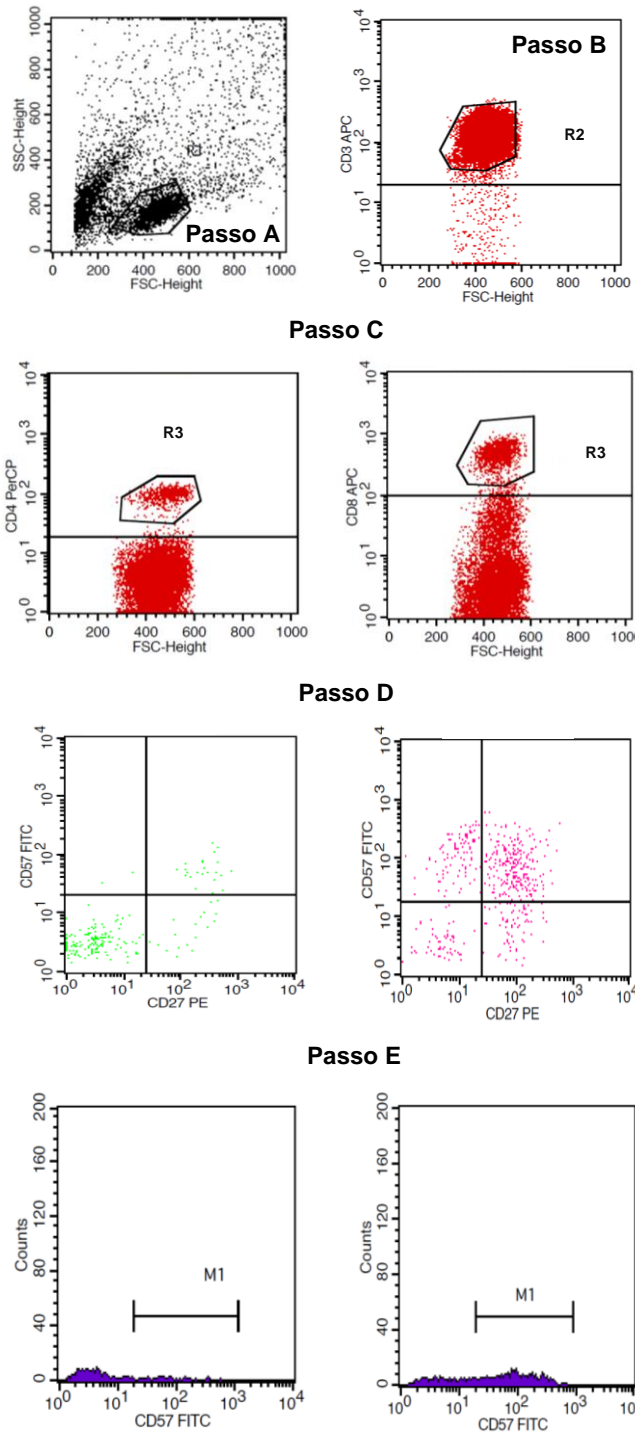


Figura 5: Modelo de análise da expressão fenotípica dos marcadores de senescência celular CD57⁺/CD27⁻. A partir da região delimitada de linfócitos totais (R1 - Passo A) define-se a população de linfócitos T CD3⁺ (R2 - Passo B), e em função destas, são definidas as subpopulações linfocitárias T CD4⁺ e T CD8⁺ (R3 - Passo C). Os percentuais dessas células expressando o fenótipo CD57⁺CD27⁻ são obtidos a partir da análise dos *dotplots* (Passo D). A monoexpressão de CD57 é avaliada a partir da análise dos histogramas em função de cada subpopulação T (Passo E). Perfil representativo de um indivíduo saudável.

3.6 Quantificação dos fatores solúveis associados à translocação de produtos microbianos

- **Lipopolissacarídeo (LPS)**

As amostras de plasma estocadas a -70°C foram descongeladas e diluídas em água livre de endotoxina, e os níveis de LPS foram quantificados usando o kit de ensaio comercial Limulus amoebocyte lysate QCL-1000 (Cambrex, Milan, Italy), de acordo com as recomendações do fabricante. Este consiste em um ensaio cromogênico quantitativo para a detecção de endotoxinas provenientes de bactérias Gram-negativas. A leitura final da reação foi determinada por espectrofotometria em um comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL), e o nível de sensibilidade foi 10 pg/mL.

- **CD14 solúvel (sCD14)**

Os níveis de sCD14 foram quantificados nas amostras de plasma estocados a -70°C através do kit comercial Quantikine Human sCD14 (R&D Systems, Minneapolis, Maryland, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A cor desenvolvida em cada poço foi proporcional à quantidade de sCD14 presente em cada amostra. A densidade óptica foi determinada pelo equipamento Microplatereader Benchmark (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) à 450nm. Os resultados foram expressos em nanogramas por mililitro (ng/mL), e o limite mínimo de detecção foi 125 ng/mL.

3.7 Dosagem sérica de Imunoglobulinas G (IgG) e subclasses IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania*

Os níveis de IgG anti-*Leishmania* e suas subclasses foram dosados através de ensaio imunoenzimático (ELISA) conforme previamente descrito por Fagundes-Silva e colaboradores (2012). Em suma, antígenos solúveis de promastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), em uma

concentração de 40 µg/mL, foram utilizados para realização do *coating* ou cobertura da microplaca de poliestireno de fundo plano (Nuncimmuno Plate, Roskilde, Denmark), e incubados a 4°C em câmara úmida de modo *overnight* pelo período de 20 horas. Após lavagens seguidas pelo bloqueio da placa com o tampão contendo PBS + 0,05% de Tween 20 e 10% de soro fetal bovino (SFB), o soro diluído (1:50) dos pacientes LV/HIV-1 foram adicionados à placa e submetidos à incubação em temperatura ambiente. Após seis lavagens, anticorpos monoclonais anti-IgG (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA), anti-IgG1 e anti-IgG3 humanas (ZymedLaboratories Inc., San Francisco, CA, EUA), conjugados à peroxidase, foram adicionados nas diluições de 1:1000, 1:200 e 1:400, respectivamente, e a placa contendo o complexo antígeno – amostra – anticorpo foi novamente incubada a temperatura ambiente. Depois de novas lavagens, a reação enzimática foi revelada e uma solução foi utilizada para interromper a reação. A absorbância foi detectada através do equipamento Microplatereader Benchmark (Bio-RadLaboratories, Hercules, CA, EUA) à 492 nm e os resultados foram expressos como índice de ELISA (IE), o qual se baseia na divisão da média da densidade óptica (DO) das duplicatas das amostras dos pacientes, pela média da DO obtida dos controles negativos.

3.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPadPrism (version5.0, San Diego, CA, USA). As comparações entre os dois grupos de pacientes coinfectados (recidivantes e não-recidivantes) foram realizadas através de testes não-paramétricos, Mann Whitney. Testes não-paramétricos foram realizados usando o teste de Wilcoxon, quando os mesmos indivíduos foram comparados nas diferentes visitas. Quando três ou mais visitas foram comparadas simultaneamente, foi utilizado o teste ANOVA (Kruskal-Wallis *test*) e o pós-teste de Dunns. Foram consideradas diferenças significativas aquelas com valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Características clínicas, demográficas e curso evolutivo dos pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1)

Todos os casos de associação LV/HIV-1 foram admitidos no estudo quando apresentavam a LV ativa (seja abertura de caso, primeiro episódio ou recidiva da doença), correspondendo a um total de 18 pacientes coinfectados. Estes foram acompanhados durante 12 meses, totalizando oito visitas ambulatoriais. As características demográficas e a evolução clínica dos 18 pacientes LV/HIV-1 estão apresentadas na Tabela 1.

A média de idade dos pacientes estudados foi de $37,5 \pm 0,7$ anos, com mediana de 38,5 anos (intervalo interquartil – IQR: 34,5 a 45 anos). Quanto ao sexo, 14 pacientes eram do sexo masculino (77,7 %) e quatro do sexo feminino (22,3 %). A via parenteral foi apontada como principal via de exposição ao HIV-1. A maioria dos pacientes LV/HIV-1 alegou ter comportamentos de risco para a transmissão do vírus, seja pela via sexual e/ou através do uso de drogas injetáveis. Durante o acompanhamento ocorreram dois óbitos (15,4%) devido a complicações decorrentes das frequentes reativações.

Todos os pacientes LV/HIV-1 estavam submetidos à TARV. O esquema de terapia utilizado consistiu em dois inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos, associados a um inibidor de protease, ou a um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo, seguindo as diretrizes terapêuticas do Ministério da Saúde.

No que se refere à leishmaniose visceral, nove dentre os 18 pacientes avaliados já haviam apresentado episódios prévios da doença, ou seja, já haviam apresentado sintomas de LV em algum momento anterior à admissão no estudo. Outros três pacientes reativaram a LV ao longo do acompanhamento e por isso, estes casos constituíram o grupo dos recidivantes (R, n=12). Os seis pacientes restantes apresentaram abertura de caso da doença, constituindo o grupo de não-recidivantes, ou seja, que apresentaram um único episódio da doença ao longo da vida.

Em relação aos fatores relacionados às recidivas da LV, como já mencionado, os pacientes LV/HIV-1 foram agrupados de acordo com o número de episódios de LV ao longo da vida: aqueles que tiveram LV uma única vez (não recidivantes: NR=6), e aqueles que apresentaram mais de um episódio ativo da doença (recidivantes: R=12). Neste contexto, os pacientes recidivantes foram aqueles que apresentaram uma menor taxa de normalização dos parâmetros laboratoriais ao longo do acompanhamento, maior dificuldade na depuração da *Leishmania* após o tratamento, além de menores contagens de linfócitos T CD4⁺ mesmo após 12 meses de tratamento, conforme descrito a seguir. No entanto, a razão entre linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi inferior a 1,0 para todos os pacientes, ao longo de todo o acompanhamento.

Tabela 1: Evolução clínica e características demográficas dos 18 pacientes com leishmaniose visceral coinfetados pelo HIV-1 (LV/HIV-1).

Identificação do paciente	Idade, sexo	Tempo em meses desde o diagnóstico da infecção pelo HIV-1	Uso da TARV antes do primeiro episódio de LV	Tempo em meses entre o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 e da LV	Tempo em meses desde o primeiro episódio de LV	Episódios prévios de LV (números)	Tratamento anti- <i>Leishmania</i>	Profilaxia secundária anti- <i>Leishmania</i>	Tempo total em meses de acompanhamento no estudo	Evolução clínica quanto a ocorrência de recidivas
GBS (HLV01)	53 anos, masculino	4	Não	4	NA	Não	Anfotericina B deoxicolato por 20 dias	Anfotericina B deoxicolato / quinzenalmente por 2 meses (até recuperação das células T CD4)	12	Sem recidivas da LV
WLA (HLV03)	38 anos, masculino	179	Sim	179	NA	Não	Anfotericina B deoxicolato por 3 dias, substituída por lipossomal 20 mg/kg dose total	Paciente abandonou acompanhamento e não recebeu profilaxia	6*	Recidiva da LV aos 6 meses pós-tratamento (mpt) e óbito
JRO (HLV05)	25 anos, feminino	78	Não	49	29	Sim (1)	Anfotericina lipossomal 20 mg/kg dose total	Uso irregular da profilaxia	12	Sem recidivas da LV
MF (HLV06)	51 anos, masculino	4	Não	4	NA	Não	Anfotericina B deoxicolato por 20 dias	Anfotericina B deoxicolato / quinzenalmente por 20 meses (suspensa quando contagem de células T CD4 estabilizou em cerca de 200 c/s/mm ³)	12	Sem recidivas da LV
APS (HLV07)	33 anos, feminino	20	Sim	20	NA	Não	Anfotericina B deoxicolato por 20 dias	Anfotericina B deoxicolato / quinzenalmente por 12 meses (suspensa quando contagem de células T CD4 estabilizou em cerca de 250 c/s/mm ³)	12	Sem recidivas da LV
RAS (HLV09)	39 anos, masculino	41	Sim	21	19	Sim (1)	Anfotericina lipossomal 20 mg/kg dose total	Anfotericina lipossomal / quinzenalmente sob regime regular	12	Recidiva da LV aos 4 e 12 mpt
LPO (HLV010)	35 anos, masculino	27	Sim	17	9	Sim (1)	Anfotericina lipossomal 20 mg/kg dose total	Anfotericina B deoxicolato / quinzenalmente por 7 meses (até recuperação das células T CD4)	12	Sem recidivas da LV
CMS (HLV012)	40 anos, masculino	134	Não	52	82	Sim (4)	Anfotericina lipossomal 20 mg/kg dose total	Anfotericina lipossomal / quinzenalmente sob regime regular	6*	Recidiva da LV aos 6 mpt
CMRR (HLV013)	37 anos, feminino	5	Não	5	NA	Não	Anfotericina B deoxicolato por 5 dias, substituída por lipossomal 20 mg/kg dose total	Anfotericina B deoxicolato /quinzenalmente por 10 meses (suspensa quando contagem de células T CD4 estabilizou em cerca de 200 c/s/mm ³)	12	Sem recidivas da LV
PJS (HLV016)	41 anos, masculino	31	Sim	31	NA	Não	Anfotericina B deoxicolato por 20 dias	Anfotericina B deoxicolato / quinzenalmente por 4 meses (até recuperação das células T CD4)	12	Sem recidivas da LV

WMC (HLV017)	38 anos, masculino	14	Sim	14	NA	Não	Anfotericina B deoxicolato por 20 dias	Anfotericina B deoxicolato / quinzenalmente por 18 meses (até recuperação das células T CD4), porém com uso irregular	12	Recidiva da LV aos 4, 6 e 12 mpt
PRP (HLV019)	45 anos, masculino	69	Sim	69	NA	Não	Anfotericina B deoxicolato por 20 dias	Anfotericina B deoxicolato / quinzenalmente por 13 meses (até recuperação das células T CD4), porém com uso irregular	12	Recidiva da LV aos 8 mpt
JTS (HLV021)	45 anos, masculino	139	Sim	113	25	Sim (4)	Anfotericina lipossomal 20 mg/kg dose total	Uso irregular da profilaxia (anfotericina B deoxicolato / quinzenalmente)	12	Recidiva da LV aos 2, 8 e 12 mpt
VPGS (HLV022)	21 anos, masculino	25	Não	1	24	Sim (1)	Anfotericina lipossomal 20 mg/kg dose total	Anfotericina B deoxicolato / quinzenalmente por 13 meses (até recuperação das células T CD4)	12	Recidiva da LV aos 6 mpt
AMP (HLV023)	39 anos, masculino	239	Sim	117	121	Sim (7)	Anfotericina lipossomal 20 mg/kg dose total	Anfotericina lipossomal / semanalmente sob regime regular	12	Recidiva da LV aos 6 e 12 mpt
AMGN (HLV024)	37 anos, feminino	155	Sim	107	47	Sim (1)	Anfotericina B deoxicolato por 20 dias	Anfotericina B deoxicolato / quinzenalmente por 4 meses, porém com uso irregular	4**	Sem recidivas da LV durante o seguimento
DCLS (HLV025)	30 anos, masculino	2	Não	2	NA	Não	Anfotericina B deoxicolato por 25 dias	Anfotericina B deoxicolato / quinzenalmente por 13 meses (até recuperação das células T CD4)	12	Sem recidivas da LV
ACL (HLV026)	52 anos, masculino	128	Não	0	128	Sim (2)	Anfotericina lipossomal 20 mg/kg dose total	Anfotericina B deoxicolato / quinzenalmente por 8 meses (até recuperação das células T CD4)	12	Sem recidivas da LV

* casos de óbito; ** caso de abandono do acompanhamento; NA (Não se aplica); LV (leishmaniose visceral); mpt (meses pós-tratamento).

4.2 Avaliação do grau de comprometimento imunológico dos pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1)

O nível de reconstituição imunológica apresentado pelos pacientes LV/HIV-1 foi avaliado através das contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺.

A Figura 6 apresenta as contagens absolutas de células T CD4⁺ observadas para os pacientes LV/HIV-1, na fase ativa da leishmaniose, no pós-tratamento anti-*Leishmania*, no sexto e no décimo segundo meses seguintes. De modo geral, verificou-se que independente da fase clínica avaliada, ou seja, ativa ou pós-tratamento, os pacientes coinfectados LV/HIV-1 apresentaram, em sua maioria, contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ inferiores a 350 linfócitos/mm³, limite preconizado para o estabelecimento da profilaxia secundária (ativo - mediana: 98,5 células/mm³ [IQR: 63,25 a 158,8 céls/mm³] e pós-tratamento - mediana: 147 células/mm³ [IQR: 96 a 254 céls/mm³]). Além disso, as medianas obtidas durante todas as fases do acompanhamento foram bem inferiores àquela apresentada por pacientes monoinfectados pelo HIV-1 sem LV (mediana: 377 células/mm³ [IQR: 222,5 a 450,5 céls/mm³]), e como já esperado, pelos controles sadios (mediana: 944 células/mm³ [IQR: 820,3 a 1081 céls/mm³]). Apesar disso, um aumento significativo no número de células T CD4⁺ foi observado para os períodos de seis e 12 meses pós-tratamento (6 mpt - mediana: 174 células/mm³ [IQR: 120 a 299,5 céls/mm³] e 12 mpt - mediana: 228 células/mm³ [IQR: 79 a 311,3 céls/mm³]) em comparação à fase ativa da doença (*p<0,05). Ao longo do período de acompanhamento, cinco pacientes conseguiram obter um ganho importante de células, apresentando valores de linfócitos T CD4⁺ superiores a 350 linfócitos/mm³, os quais foram sustentados ou não (Figura 6).

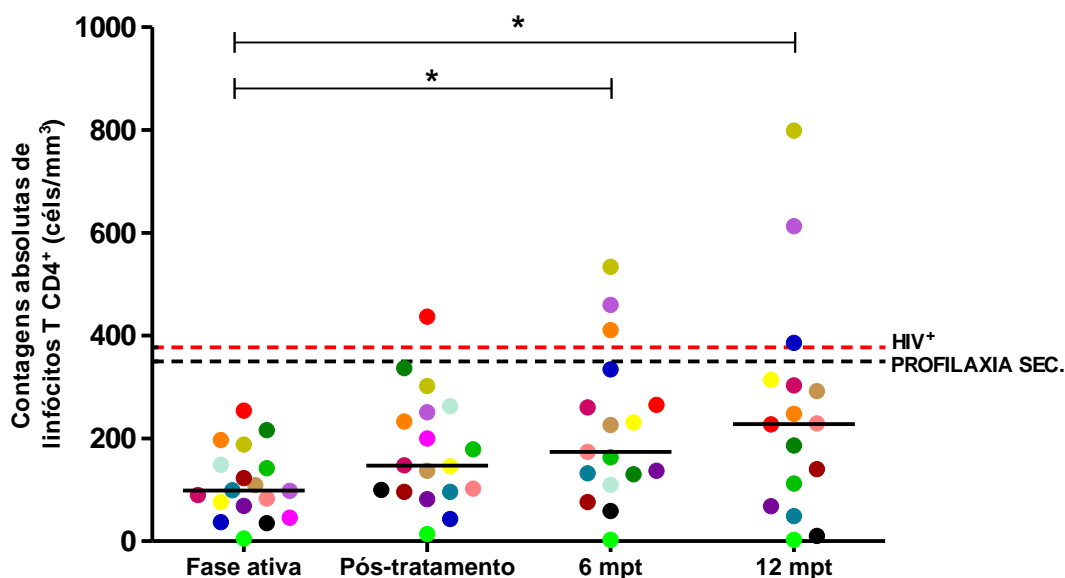


Figura 6: Distribuição das contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ apresentadas pelos pacientes com leishmaniose visceral coinfetados pelo HIV-1 (LV/HIV-1), nas diferentes fases do acompanhamento prospectivo. A linha pontilhada preta representa o limite de 350 células/mm³, preconizado para o estabelecimento da profilaxia secundária. A linha pontilhada vermelha representa o valor de mediana apresentado por indivíduos infectados apenas pelo HIV-1 (mediana: 377 células/mm³). Cada símbolo representa um paciente e cada cor representa o mesmo paciente nos diferentes períodos do acompanhamento. As barras horizontais representam os valores de medianas. Seis meses pós-tratamento (6 mpt); 12 meses pós-tratamento (12 mpt). O asterisco denota diferenças estatisticamente significantes entre as fases do acompanhamento. *p<0,05.

Quando todos os pacientes foram observados prospectiva e simultaneamente (Figura 6), já foi possível verificar um padrão de distribuição das contagens absolutas de células T CD4⁺ que difere entre os pacientes avaliados, sobretudo nos períodos posteriores ao tratamento. Tal fato se confirmou quando os pacientes LV/HIV-1 foram separados em recidivantes (R) e não recidivantes (NR)

Nas fases iniciais do acompanhamento, ou seja, na fase ativa e de pós-tratamento de LV, ambos os grupos NR e R apresentaram valores similares das contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ (mediana NR – ativa: 86,5 células/mm³ [IQR: 66,25 a 120,5 céls/mm³] e pós-tratamento: 147 células/mm³ [IQR: 87,25 a 263,8 céls/mm³]); (mediana R – ativa: 116 células/mm³ [IQR: 51,75 a 185 céls/mm³] e pós-tratamento: 158 células/mm³ [IQR: 96 a 255,5 céls/mm³]). Entretanto, nos períodos de seis e 12 meses pós-tratamento, os pacientes NR mostraram um aumento significativo de células T CD4⁺ (mediana – 6 mpt: 297 células/mm³ [IQR: 216,8 a 478,5 céls/mm³] e

12 mpt: 350 células/mm³ [IQR: 284,5 a 659,5 céls/mm³]) em comparação aos pacientes R que, por sua vez, mantiveram valores similares à fase ativa da doença (mediana – 6 mpt: 132 células/mm³ [IQR: 76 a 226 céls/mm³] e 12 mpt: 126 células/mm³ [IQR: 39,25 a 232,3 céls/mm³]). Este aumento de células T CD4⁺ observado nos pacientes NR também se mostrou significativo quando comparado aos valores apresentados por esses mesmos pacientes na fase ativa da LV (Figura 7).

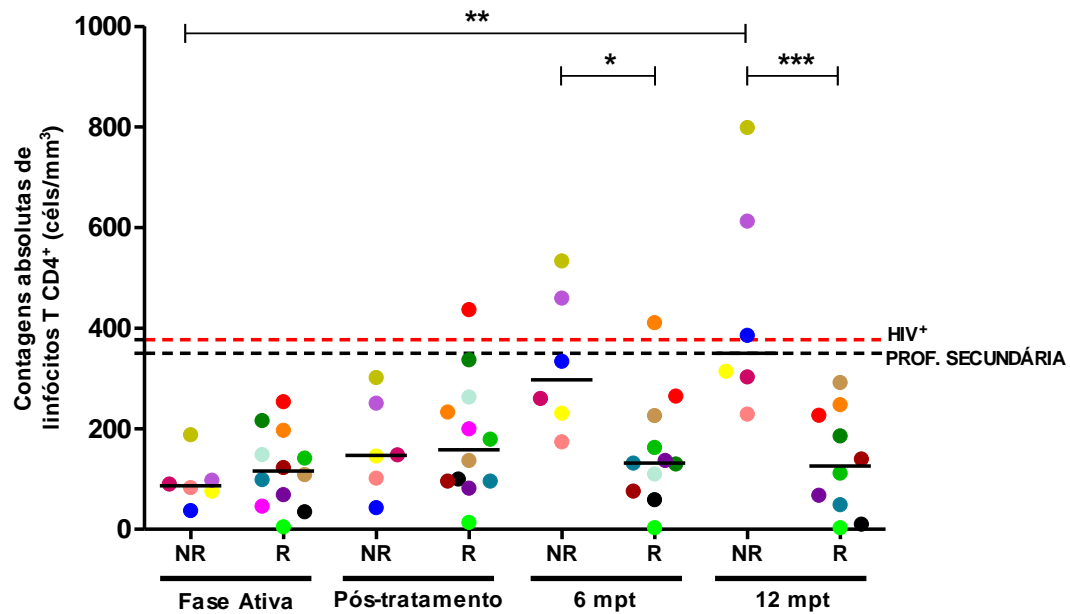


Figura 7: Perfil das contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ apresentadas pelos pacientes com leishmaniose visceral coinfetados pelo HIV-1 (LV/HIV-1), que apresentaram um único episódio ativo da LV (NR) ou com frequentes recidivas da doença (R). NR representa pacientes não recidivantes da LV, enquanto R se refere aos pacientes recidivantes da doença. A linha pontilhada preta representa o limite de 350 células/mm³, preconizado para o estabelecimento da profilaxia secundária. A linha pontilhada vermelha representa o valor de mediana apresentado por indivíduos infectados apenas pelo HIV-1 (mediana: 377 células/mm³). Cada símbolo representa um paciente e cada cor representa o mesmo paciente nos diferentes períodos do acompanhamento. As barras horizontais representam os valores de medianas. Seis meses pós-tratamento (6 mpt); 12 meses pós-tratamento (12 mpt). O asterisco denota diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (NR e R) ou entre os diferentes períodos avaliados. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005.

4.3 Avaliação dos parâmetros virológicos e parasitológicos dos pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1)

No momento da admissão no estudo, ou seja, na fase ativa da leishmaniose visceral, 13 dos 18 pacientes LV/HIV-1 já apresentaram carga viral baixa ou indetectável, devido ao uso da TARV. Esse controle da replicação viral foi seguido durante todo o acompanhamento, de modo que a maioria dos pacientes LV/HIV-1 avaliados seguiram nas fases de pós-tratamento com níveis baixos ou mesmo indetectáveis de cópias de RNA viral/mL, como pode ser observado na Tabela 2.

Como já esperado, o controle da carga parasitária foi obtido para a maioria dos pacientes coinfectados logo após o tratamento anti-*Leishmania*, de modo que 10 pacientes apresentaram uma carga parasitária indetectável, enquanto cinco mostraram níveis relativamente baixos desse parâmetro (abaixo de 1500 cópias). No entanto, e de forma interessante, apenas pacientes recidivantes mantiveram níveis detectáveis de cópias do DNA de *Leishmania* (/mL), ao longo do período de acompanhamento, após o tratamento da LV (Tabela 2).

Apesar disto, nenhuma correlação pôde ser observada entre os níveis de cargas viral e parasitária e as contagens de células T CD4⁺ (dados não apresentados). De forma preliminar, estes resultados apontaram que tais parâmetros pareciam ser independentes da baixa reconstituição imunológica apresentada pelos pacientes LV/HIV-1 e, portanto, outros fatores, como os níveis de ativação, poderiam estar envolvidos nesse processo.

Tabela 2: Número de cópias por mL de RNA viral e kDNA de *Leishmania (L.) infantum* apresentado por pacientes com leishmaniose visceral coinfetados pelo HIV-1 (LV/HIV-1).

		Fase ativa		Pós-tratamento		6 mpt		12 mpt	
		Carga Viral (RNA copias/mL)	Carga Parasitária (kDNA copias/mL)	Carga Viral (RNA copias/mL)	Carga Parasitária (kDNA copias/mL)	Carga Viral (RNA copias/mL)	Carga Parasitária (kDNA copias/mL)	Carga Viral (RNA copias/mL)	Carga Parasitária (kDNA copias/mL)
HLV01	NÃO- RECIDIVANTE	20272	38171	571	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	1.3
HLV06		55	206162	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável
HLV07		Indetectável	159550	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável
HLV013		153316	Indetectável	1118	Indetectável	Indetectável	Indetectável	60 (10 mpt)	Indetectável
HLV016		Indetectável	78	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável
HLV025		51	506308	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	1061258	Indetectável
HLV03	RECIDIVANTE	Indetectável	46989	Indetectável	Indetectável	Abandono de seguimento			
HLV05		1146	37271	181	Indetectável	394230	Indetectável	157833	Indetectável
HLV09		Indetectável	41.1	Indetectável	12718	Indetectável	0.8	Indetectável	1334
HLV010		Indetectável	3147	--	1467	Indetectável	Indetectável	--	Indetectável
HLV012		405	0.2	194	3024000	23004	5400	Óbito	
HLV017		Indetectável	115454	Indetectável	430	Indetectável	2663	Indetectável	--
HLV019		Indetectável	40177	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	--	23.5
HLV021		56543	813	4897	622	86899	3262	178326	Indetectável
HLV022		Indetectável	38281	60	220	--	7909	82	54
HLV023		47	25118	Indetectável	6369	339	2030	--	1.1
HLV024		135957	81656	68075	Indetectável	--	24705	190839	4442
HLV026		250310	15701	7311	116	133219	Indetectável	--	Indetectável

HLV (Identificação do paciente – HIV-1/leishmaniose visceral); mpt (meses pós-tratamento).

4.4 Avaliação do grau de ativação celular dos pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1, acompanhados prospectivamente

Em um estudo transversal com pacientes LV/HIV-1 realizado previamente pelo nosso grupo, uma análise multivariada apontou que a “doença leishmaniose”, mas não a carga parasitária, e a translocação de produtos microbianos do lúmen intestinal para corrente sanguínea atuam como os principais fatores de risco associados ao *status* de ativação (Santos-Oliveira et al, 2013).

De fato, no presente estudo, os pacientes LV/HIV-1 avaliados ao longo de 12 meses de acompanhamento também apresentaram percentuais elevados de linfócitos T CD4⁺ (Figura 8A) e T CD8⁺ (Figura 8B) ativados (CD38⁺HLA-DR⁺), em especial quando comparados aos valores apresentados por controles sadios (mediana – CD4: 0,41% [IQR: 0,15 a 1,77] e CD8: 0,41% [IQR: 0,23 a 5,92] - linhas tracejadas vermelhas). No entanto, como esperado, os níveis de ativação celular foram mais elevados na subpopulação de linfócitos T CD8⁺ (Figura 8B). No que se refere aos grupos NR e R, ambos apresentaram um grau de ativação de células T similarmente elevado nas fases iniciais do acompanhamento prospectivo, entre as duas subpopulações T avaliadas, como apresentado nas Figuras 8A e 8B (mediana da fase ativa NR – CD4 e CD8, respectivamente: 7,5 e 18% [IQR: 5,3 a 11,6 e 14 a 27,9], e R – CD4 e CD8, respectivamente: 7,6 e 18,6% [IQR: 5,5 a 16,9 e 14 a 24,3]). Porém, com seis meses pós-tratamento, os pacientes NR mostraram uma tendência à diminuição dos níveis de ativação em ambas subpopulações linfocitárias. Tais níveis foram significativamente menores nesses pacientes no período de 12 meses pós-tratamento (mediana – CD4 e CD8, respectivamente: 2,62 e 5,87% [IQR: 2,31 a 3,175 e 4,67 a 7,35]) quando comparados aos percentuais apresentados pelos pacientes R (mediana – CD4 e CD8, respectivamente: 11,4 e 17,02% [IQR: 5,72 a 16,14 e 12,55 a 29,46]). Estes últimos, por sua vez, mantiveram valores tão elevados quanto aos apresentados na fase ativa da LV (Figura 8A e 8B). Além disso, a tendência à normalização do *status* de ativação dos pacientes NR se confirma quando são comparados os percentuais de células T ativadas no período de 12 meses pós-

tratamento e os valores apresentados por esses mesmos pacientes na fase ativa da doença (Figura 8A e 8B).

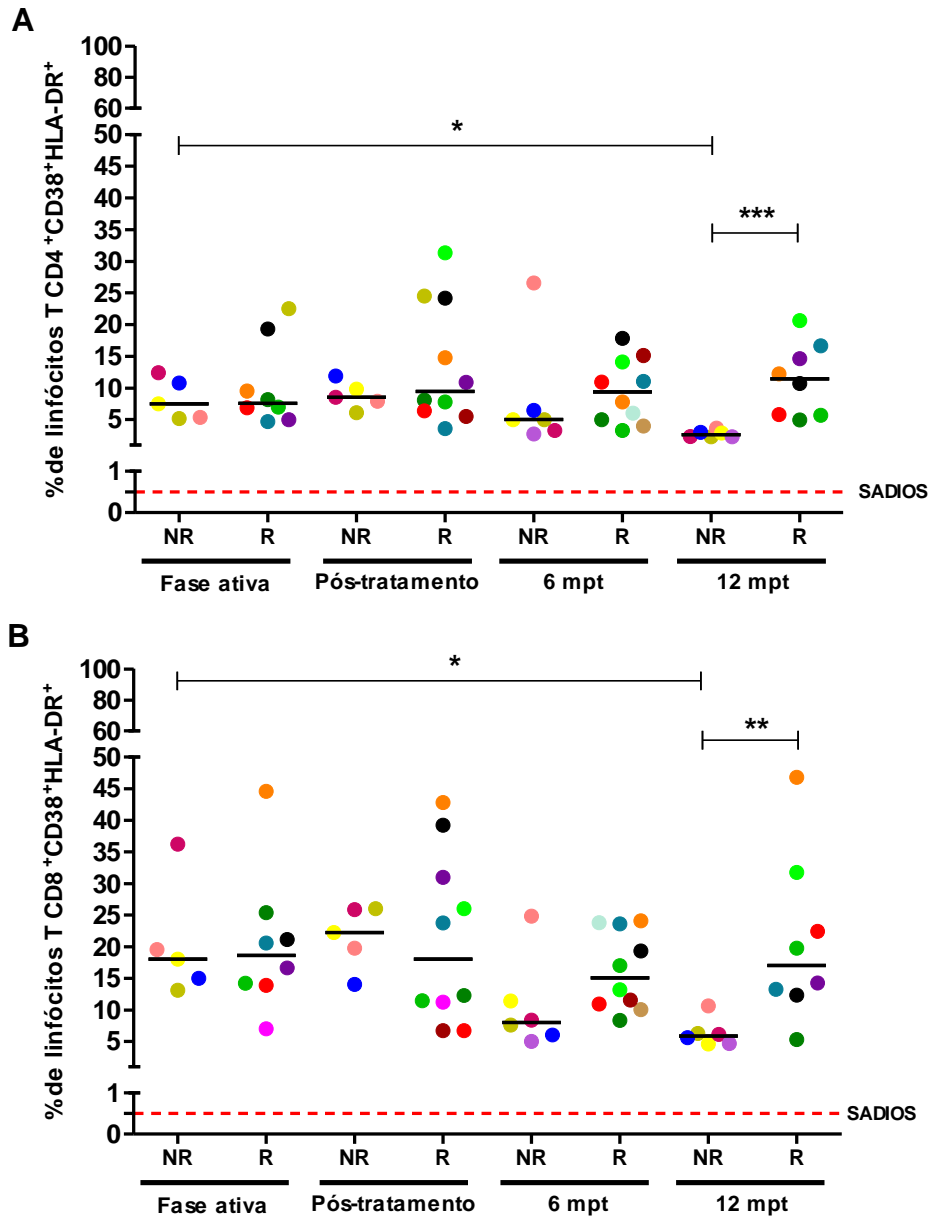


Figura 8: Percentuais de coexpressão dos marcadores de ativação celular CD38 e HLA-DR nos linfócitos T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B), em pacientes LV/HIV-1, nas diferentes fases do estudo. NR representa pacientes não recidivantes da LV, enquanto R se refere aos pacientes recidivantes da doença. A linha pontilhada vermelha representa o valor de mediana da coexpressão CD38⁺HLA-DR⁺ observado em indivíduos sadios (medianas para linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺: 0,41%). Cada símbolo representa um paciente e cada cor representa o mesmo paciente nos diferentes períodos do acompanhamento. As barras horizontais representam os valores de medianas. Seis meses pós-tratamento (6 mpt); 12 meses pós-tratamento (12 mpt). O asterisco denota diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos ou entre os diferentes períodos avaliados. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Estas observações apontam para uma possível participação da ativação celular no processo patogênico das recidivas de LV nos pacientes coinfectedados pelo HIV-1.

4.5 Avaliação do *status* inflamatório e ativado do sistema imune, através dos níveis de translocação microbiana em pacientes com leishmaniose visceral coinfectedados pelo HIV-1 (LV/HIV-1)

Similar ao que foi observado para o grau de coexpressão das moléculas de CD38 e HLA-DR, associadas à ativação de linfócitos T, os pacientes LV/HIV-1 recidivantes mantiveram níveis plasmáticos elevados de CD14 solúvel (sCD14), receptor para lipopolissacarídeo (LPS) na superfície de monócitos e macrófagos, mesmo nos períodos posteriores ao tratamento anti-*Leishmania*. Os pacientes LV/HIV-1 não recidivantes, por sua vez, diminuíram significativamente esses valores uma vez finalizado o tratamento anti-*Leishmania* (mediana: 3916 ng/mL [IQR: 3166 a 5281]) em comparação aos pacientes R (mediana: 5381 ng/mL [IQR: 4863 a 6744]), mantendo essa diferença significativa também com seis meses (mediana NR e R, respectivamente: 3050 e 5325 ng/mL [IQR: 2516 a 4172 e 4506 a 6931]) e 12 meses pós-tratamento (mediana NR e R, respectivamente: 3466 e 5769 ng/mL [IQR: 2514 a 4934 e 4241 a 7036]). Adicionalmente, essa diminuição significativa dos níveis de sCD14 apresentada pelos pacientes NR foi confirmada quando os valores observados no período de 12 mpt foram confrontados àqueles observados na fase ativa da doença (Figura 9).

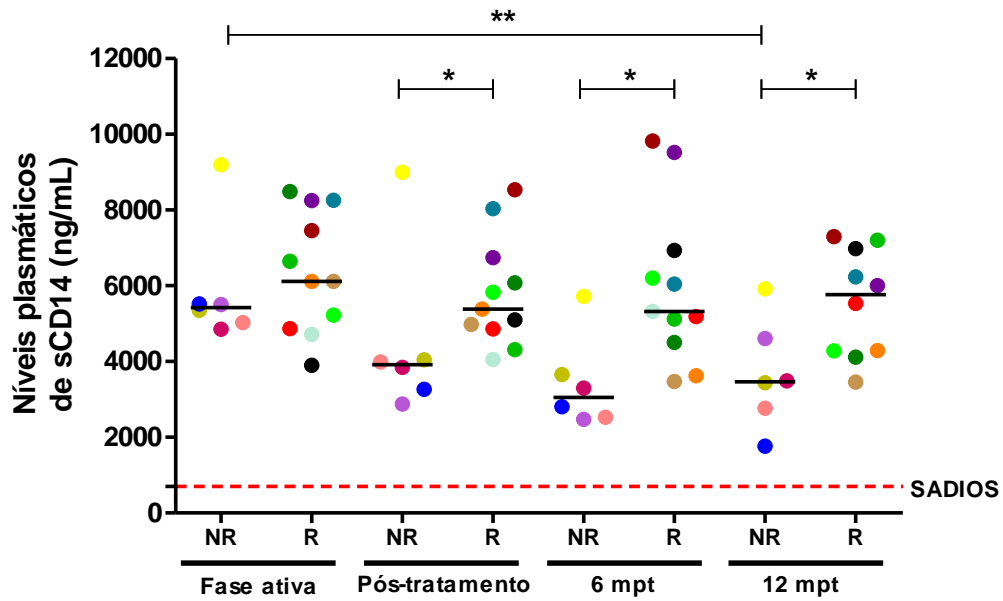


Figura 9: Níveis de CD14 solúvel (sCD14) no plasma de pacientes com leishmaniose visceral coinfetados pelo HIV-1 (LV/HIV-1), nas diferentes fases do estudo. NR representa pacientes não recidivantes da LV, enquanto R se refere aos pacientes recidivantes da doença. A linha pontilhada vermelha representa o valor de mediana apresentado por indivíduos sadios (mediana: 699 ng/mL). Cada símbolo representa um paciente e cada cor representa o mesmo paciente nos diferentes períodos do acompanhamento. As barras horizontais representam os valores de medianas. Seis meses pós-tratamento (6 mpt); 12 meses pós-tratamento (12 mpt). O asterisco denota diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos ou entre as diferentes fases do acompanhamento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

Dadas essas observações, uma análise dos níveis plasmáticos de sCD14 frente aos níveis plasmáticos de LPS foi conduzida. Conforme esperado, uma correlação positiva foi observada entre os níveis de sCD14 e os níveis de LPS apresentados pelos pacientes LV/HIV-1 ($p < 0,001$; $r = 0,42$) (Figura 10A). Este resultado aponta que, de fato, o LPS está biologicamente ativo nesses pacientes. Além disso, uma correlação significativamente negativa foi encontrada entre os níveis de sCD14 e as contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ apresentadas pelos pacientes LV/HIV-1 ($p < 0,0001$; $r = -0,5$) (Figura 10B). Tal fato parece sugerir uma importante associação entre uma ativação acentuada de componentes da imunidade inata e o prejuízo na reconstituição imunológica apresentada por esses pacientes, uma vez que a secreção de sCD14 é dependente da ativação de monócitos/macrófagos pelo LPS. Este achado está em acordo com o que foi observado para o grau de ativação da imunidade adquirida, visto através dos percentuais de linfócitos T coexpressando as moléculas CD38 e HLA-DR, uma vez que esses também se correlacionaram negativamente com as contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ apresentadas pelos pacientes LV/HIV-1 acompanhados neste estudo (dados não apresentados).

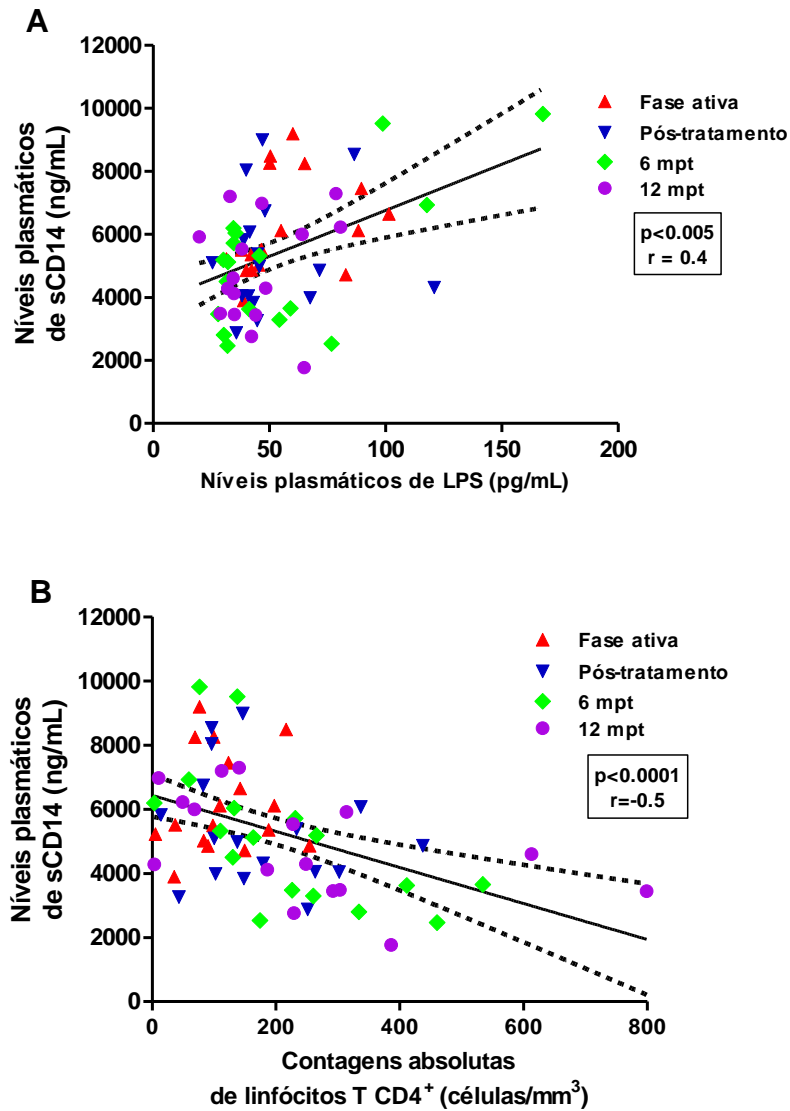


Figura 10: Relação entre fatores plasmáticos associados à translocação microbiana e o status imune apresentado por pacientes com leishmaniose visceral coinfectedos pelo HIV-1 (LV/HIV-1). **A)** Correlação entre os níveis plasmáticos de CD14 solúvel e os de lipolissacarídeos (LPS) durante todas as fases do acompanhamento prospectivo (*Spearman correlation*, $p < 0.001$; $r = 0.42$). **B)** Correlação entre os níveis de sCD14 e as contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ ao longo do seguimento (*Spearman correlation*, $p < 0.0005$; $r = -0.5$). Cada símbolo representa um paciente e as cores se referem às diferentes fases do acompanhamento prospectivo. 6 meses pós-tratamento (6 mpt); 12 meses pós-tratamento (12 mpt).

4.6 Avaliação dos níveis de imunoglobulinas (Igs) da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG3 nos pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1) ao longo do acompanhamento prospectivo

Em adição à avaliação do *status* de ativação das células T e da imunidade inata (ativação de macrófagos pela dosagem de sCD14), o grau de ativação de linfócitos B foi inferido através das dosagens séricas de imunoglobulina G (IgG) e suas subclasses (IgG1 e IgG3) anti-*Leishmania*. Os resultados foram expressos como índice de ELISA (IE). Ambos os grupos NR e R apresentaram medianas para os níveis de IgG total, IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* sempre consideravelmente mais elevadas do que aquelas apresentadas por indivíduos saudáveis, nos três subtipos de Igs avaliados (mediana IgG total, IgG1 e IgG3, respectivamente: 0,18; 0,84 e 0,18 IE [IQR: 0,08 a 0,55; 0,51 a 1,12 e 0,13 a 0,34] - linha tracejada vermelha) (Figura 11A, 11B e 11C).

Os pacientes LV/HIV-1 recidivantes (R), por sua vez, apresentaram níveis mais elevados de IgG e IgG1 comparados aos pacientes LV/HIV-1 não recidivantes (NR), ao longo de todo o acompanhamento prospectivo, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa (Figura 11A e 11B). Por outro lado, de modo semelhante ao observado para a ativação de linfócitos T, ambos os grupos apresentaram níveis de IgG3 similarmente elevados nas fases iniciais do acompanhamento (fase ativa - mediana NR e R, respectivamente: 1,81 e 1,81 IE [IQR: 0,91 a 3,78 e 0,98 a 3,1]; pós-tratamento – mediana NR e R, respectivamente: 1,72 e 1,62 IE [IQR: 0,93 a 2,60 e 1,04 a 3,15]). Porém, aos seis (mediana NR e R, respectivamente: 0,51 e 1,22 IE [IQR: 0,25 a 0,84 e 0,82 a 2,21]) e 12 meses pós-tratamento (mediana NR e R, respectivamente: 0,43 e 0,96 IE [IQR: 0,31 a 0,79 e 0,73 a 1,82]), foi observada uma diminuição significativa desses valores entre os pacientes NR quando comparados aos pacientes R. Estes últimos mantiveram níveis de IgG3 anti-*Leishmania* similares aos observados na fase ativa da doença. Tal resultado aponta uma possível relação entre a redução dos níveis de IgG3 e a manutenção da LV em remissão clínica.

Além disso, essa diminuição significativa se confirma quando se compara os níveis de IgG3 apresentados pelos pacientes NR na fase ativa com aqueles mostrados nos períodos de seis e 12 meses pós-tratamento (Figura 11C).

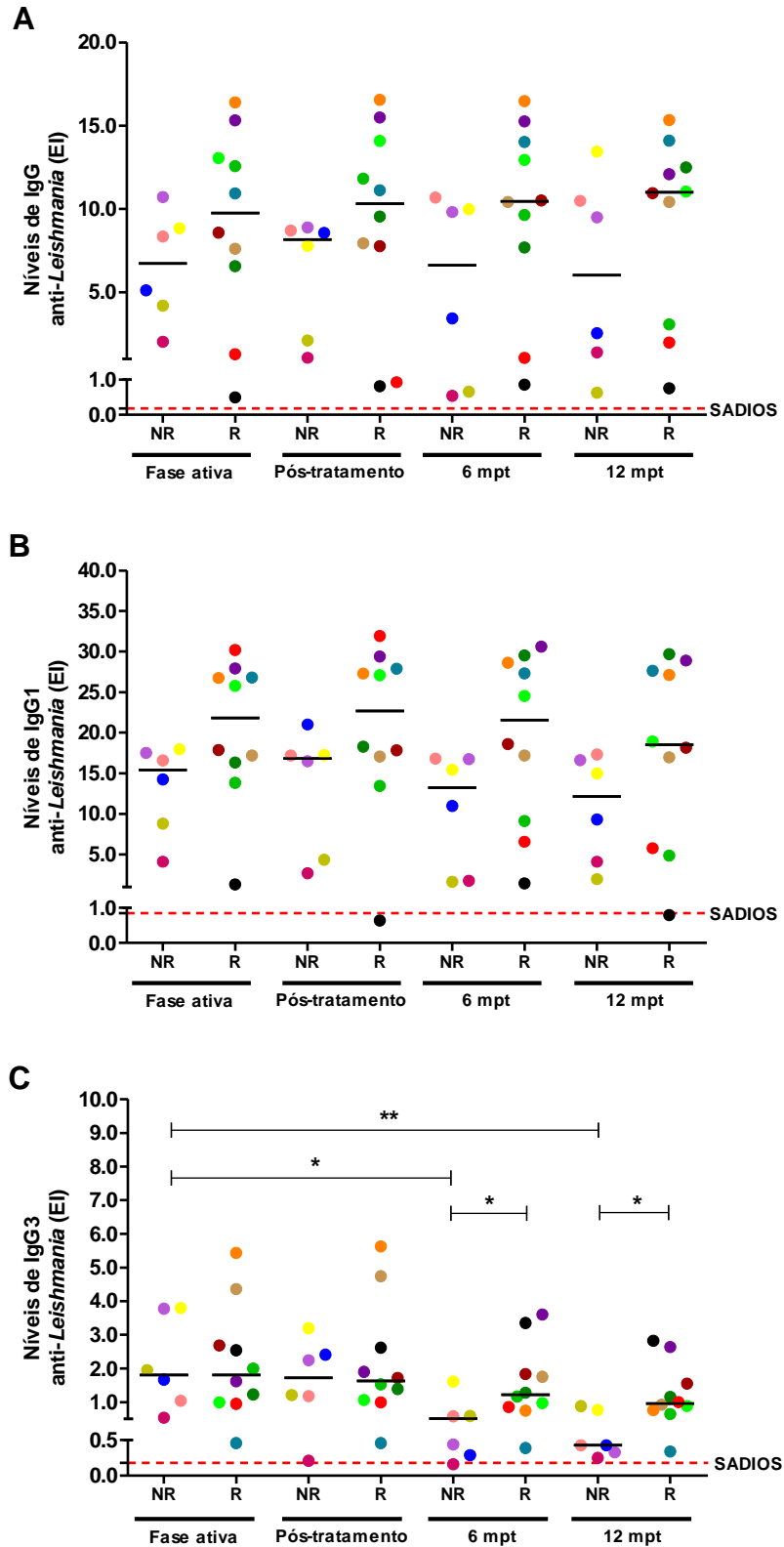


Figura 11: Níveis de Imunoglobulina G (IgG) (A) e suas subclasses IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* (B e C) no soro de pacientes com leishmaniose visceral coinfetados pelo HIV-1 (LV/HIV-1), ao longo do acompanhamento. NR representa pacientes não recidivantes da LV, enquanto R se refere aos pacientes recidivantes da doença. A linha pontilhada vermelha representa o

valor de mediana apresentado por indivíduos sadios. Cada símbolo representa um paciente e cada cor representa o mesmo paciente nos diferentes períodos do acompanhamento. As barras horizontais representam os valores de medianas. Seis meses pós-tratamento (6 mpt); 12 meses pós-tratamento (12 mpt). O asterisco denota diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos avaliados ou entre os diferentes períodos do acompanhamento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.7 Avaliação prospectiva do grau de imunosenescência de linfócitos T em pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1)

Considerando que a intensa ativação celular leva a um *status* de exaustão crônica do sistema imune, e que esse fenômeno pode contribuir para o prejuízo da resposta imune efetora e, conseqüentemente, para as frequentes recidivas da LV em pacientes infectados pelo HIV-1, foi realizada a análise do grau de imunosenescência de células T nos pacientes LV/HIV-1 ao longo do acompanhamento prospectivo, identificada pelo fenótipo CD57⁺CD27⁻.

Durante todas as fases do acompanhamento, as medianas de células T CD4⁺ e CD8⁺ senescentes apresentadas pelos pacientes LV/HIV-1 foram significativamente superiores àquelas observadas para os indivíduos sadios de mesma idade (mediana CD4 e CD8, respectivamente: 1,9 e 4,3 % [IQR: 0,4 a 4,1 e 2,6 a 10,2] – linha tracejada vermelha). Os percentuais de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ senescentes foram elevados, sobretudo no período de 12 meses pós-tratamento (mediana CD4 e CD8, respectivamente: 12,5 e 50,8 % [IQR: 2,9 a 18,2 e 22,7 a 61,0]) (Figura 12A e 12B). Nesse período, foi observado um aumento significativo nos percentuais de células T CD8⁺ senescentes quando comparados à fase ativa da LV (mediana: 33,6 % [IQR: 20,6 a 43,8]) (Figura 12B). Adicionalmente, como já é esperado quando se trata da análise da senescência celular em tais subpopulações, os percentuais de linfócitos T CD8⁺ (Figura 12B) apresentando o fenótipo CD57⁺CD27⁻ foram mais elevados quando comparados aos percentuais nos linfócitos T CD4⁺ (Figura 12A).

Finalmente, apesar do grau de senescência imune em ambas as subpopulações de células T ter sido consideravelmente elevado, nenhuma

diferença significativa pôde ser observada neste parâmetro quando se comparou os percentuais de linfócitos T senescentes apresentados pelos pacientes recidivantes (R) ou não (NR) da doença (dados não mostrados).

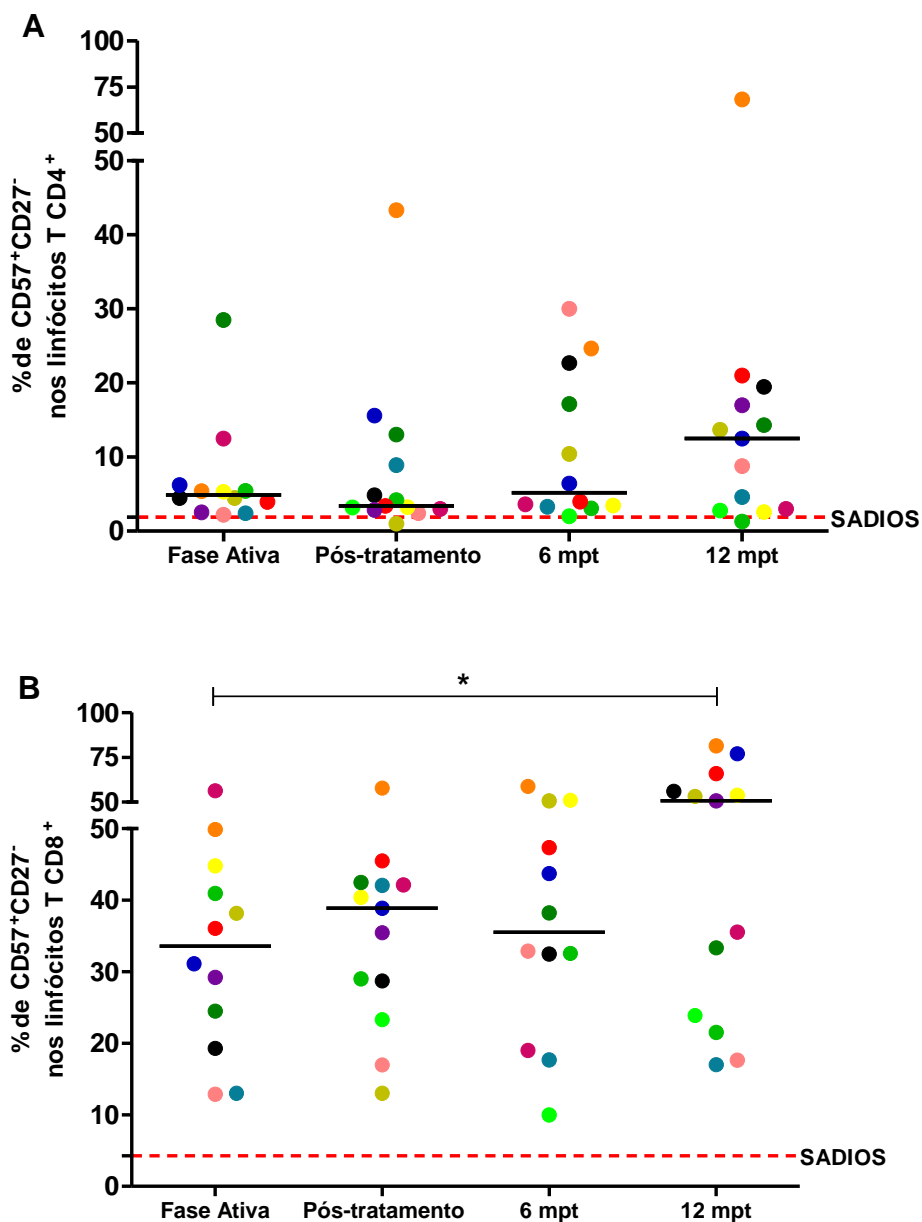


Figura 12: Percentuais de expressão do fenótipo CD57⁺CD27⁻ em linfócitos T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) em pacientes com leishmaniose visceral coinfetados pelo HIV-1 (LV/HIV-1). A linha pontilhada vermelha representa o valor de mediana apresentado por indivíduos sadios (mediana CD4 e CD8, respectivamente: 1,9 e 4,3 %). Cada símbolo representa um paciente e cada cor representa o mesmo paciente nos diferentes períodos do acompanhamento. As barras horizontais representam os valores de medianas. Seis meses pós-tratamento (6 mpt); 12 meses pós-tratamento (12 mpt). O asterisco denota diferenças estatisticamente significantes entre os dois períodos avaliados. *p<0,05.

5. DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar o impacto da ativação celular sobre o processo de reconstituição imunológica em pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1, acompanhados prospectivamente, bem como determinar a influência dessa reconstituição no prognóstico pós-tratamento anti-*Leishmania*, este estudo identificou um padrão imunológico que diferiu os indivíduos LV/HIV-1 que apresentaram um único episódio de LV ao longo da vida (não-recidivantes) daqueles que experimentaram mais de um episódio ativo da doença (recidivantes). Nesse trabalho, ambos os grupos encontravam-se submetidos à profilaxia secundária com anfotericina B e foram acompanhados de forma prospectiva ao longo de 12 meses. Diferente de outros estudos que avaliaram tais parâmetros imunológicos relacionados à associação LV/HIV-1 (Casado et al, 2015), esse modelo de acompanhamento nos permitiu avaliar não só a história prévia de LV em pacientes coinfectados, como também o estado atual do paciente a cada visita ambulatorial.

Especificamente, na casuística estudada, os pacientes LV/HIV-1 recidivantes mantiveram uma ativação crônica do sistema imune durante todo o acompanhamento, seguido de uma baixa reconstituição imunológica e de uma ocorrência acentuada de translocação microbiana para a corrente sanguínea, sugerindo o envolvimento desses fatores na perda da manutenção da remissão clínica da LV. Essa hipótese pôde ser reforçada pelo fato desse padrão imunológico apresentado, aparentemente, não estar relacionado à ausência de controle da replicação viral ou replicação parasitária, uma vez que essas foram baixas ou indetectáveis para a maioria dos pacientes LV/HIV-1, inclusive para os recidivantes, ao longo de todo o acompanhamento.

Apesar da reconstituição imune decorrente da supressão viral, obtida com o uso da TARV, ser bem descrita na infecção pelo HIV-1 (Powderly et al, 1998; Rudy et al, 2015), a manutenção das contagens de células T CD4⁺ em níveis baixos foi uma característica marcante entre os pacientes LV/HIV-1 recidivantes. Esse resultado foi de acordo com a metanálise publicada por Cota e colaboradores (2011), a qual demonstrou que a ausência de recuperação imunológica após o tratamento para a LV primária pode se constituir em um fator preditivo de recidivas da doença em pacientes infectados pelo HIV. Em

contrapartida, os pacientes não-recidivantes apresentaram sinais de reconstituição imune no decorrer do acompanhamento, mostrando um aumento significativo nos valores de células T CD4⁺ circulantes, muito provavelmente em decorrência da diminuição do grau de ativação e, secundariamente, de um controle parasitário mais bem sucedido, que perdurou até o final do acompanhamento clínico, em função do tratamento anti-*Leishmania*. Por outro lado, a manutenção dos níveis elevados de ativação celular, seja linfocitária ou da imunidade inata (secreção de sCD14 por monócitos/macrófagos), entre os pacientes LV/HIV-1 recidivantes, mesmo sob um controle viral e parasitário bem sucedido, poderia estar diretamente associada ao fato desses pacientes possuírem um tempo de exposição ao HIV-1 mais prolongado (Tabela 1), além de um intervalo maior entre o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 e o primeiro episódio ativo da LV. Por outro lado, na nossa casuística, um tempo mais prolongado de exposição ao vírus também significou um tempo maior de submissão à TARV e, dessa forma, de um controle da replicação viral mais precoce. De fato, nove dos 11 pacientes recidivantes apresentaram uma carga viral baixa ou indetectável já no momento da admissão no estudo. Ainda assim, o grau de ativação imune se encontrava elevado nesta fase, sendo mantido mesmo após o tratamento anti-*Leishmania* e nos períodos finais do acompanhamento. Esses resultados corroboram com o que tem sido descrito para indivíduos infectados pelo HIV sem LV, os quais persistem com um *status* inflamatório e ativado exacerbado apesar do uso da TARV e do sucesso no controle viral (Karim et al, 2014; Wada et al, 2015; Rudy et al, 2015).

Alguns estudos têm descrito que a persistência do elevado grau de ativação de células T induzido pelo HIV-1 em indivíduos com supressão viral pela TARV, pode predizer um prognóstico tão ruim quanto o de pacientes positivos para o HIV-1 não tratados (Bofill et al, 1996; French et al, 2009), estando relacionada com a progressão da doença, por exemplo, através do desenvolvimento de complicações vasculares (Karim et al, 2014), do aumento da taxa de mortalidade (Hunt et al, 2011) e da maior suscetibilidade a outras doenças infecciosas, dentre elas as leishmanioses (Da-Cruz et al, 2006; Vivarini et al, 2015). De fato, o nosso grupo já havia mostrado anteriormente, porém de forma transversal, que pacientes de associação LV/HIV-1 apresentavam altos níveis de ativação celular, mesmo sob o controle da carga

viral pelo uso da TARV (Santos-Oliveira et al, 2010). Além disso, esse *status* de ativação também se mostrou elevado entre pacientes coinfectados em remissão clínica da LV, apontando que a infecção por *Leishmania*, independente da carga parasitária, pode se constituir em um fator adicional para explicar o elevado grau de ativação e de comprometimento imune nos casos de coinfecção *Leishmania*/HIV-1 (Santos-Oliveira et al, 2013).

Na presente avaliação, embora os pacientes LV/HIV-1 não-recidivantes tenham apresentado níveis de ativação similarmente elevados na fase inicial do acompanhamento, esse *status* imunológico foi revertido nos períodos posteriores ao tratamento da LV, de modo que os percentuais de linfócitos T ativados diminuíram significativamente nos seis e 12 meses pós-tratamento. Além disso, a própria ausência de recidivas da LV pode melhorar o *status* imunológico geral desses pacientes, uma vez que este tende a se apresentar cada vez mais comprometido a cada nova reativação da doença em pacientes coinfectados com HIV-1.

A persistência de baixos níveis de DNA parasitário no sangue periférico tem sido demonstrada em pacientes LV/HIV-1, em detrimento de uma resposta clínica adequada à terapia específica. Tal fato conduz a uma condição clínica caracterizada por uma alternância entre as formas assintomáticas e sintomáticas da doença (del Giudice et al, 2002). Embora a maioria dos pacientes recidivantes também tenha apresentado sucesso no controle parasitário, parte deles ainda apresentou uma carga parasitária detectável nos períodos finais do acompanhamento. Dessa forma, apesar dos níveis baixos, mas detectáveis de DNA de *Leishmania* no sangue periférico de pacientes LV/HIV-1, nem sempre acarretarem em uma recidiva clínica da doença, apenas os pacientes recidivantes mantiveram a carga parasitária detectável após o tratamento, e mesmo em vigência da profilaxia secundária.

No entanto, ainda é pouco elucidado se a reconstituição imunológica limitada, bem como a ocorrência de frequentes reativações da LV são, primariamente, conduzidas pela persistência do parasito ou por um processo imunológico subjacente, como o já descrito grau de ativação imunológica. Apesar disso, este estudo encontrou uma correlação significativamente negativa entre os níveis de ativação de linfócitos T CD8⁺ e as contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ (dados não mostrados). Tal fato indica mais uma

vez que, além das consequências da própria leishmaniose visceral (Santos-Oliveira et al, 2013), a manutenção de níveis elevados de ativação pode estar relacionada com o prejuízo na recuperação imunológica em pacientes de associação LV/HIV-1, mesmo que esses façam uso da profilaxia secundária.

Esta hipótese foi reforçada quando observamos, simultaneamente, uma forte correlação entre as baixas contagens de células T CD4⁺ e o intenso grau de ativação da imunidade inata, visto através dos níveis elevados de sCD14. Esse resultado pode estar indiretamente associado ao impacto que os níveis de translocação microbiana podem exercer sobre o sistema imune dos pacientes LV/HIV-1, uma vez que os níveis de sCD14 foram positivamente correlacionados aos níveis elevados de LPS observados nesses pacientes. Essa relação positiva entre os níveis de sCD14 e de LPS nos pacientes coinfectados ao longo do acompanhamento expôs duas informações de extrema relevância: a primeira, que o LPS se encontra biologicamente ativo nesses pacientes; e a segunda, como uma consequência da primeira, que os níveis de translocação microbiana parecem, de fato, estar relacionados com o *status* inflamatório exacerbado dos pacientes LV/HIV-1. A translocação de produtos microbianos, tais como o LPS, do lúmen intestinal para a corrente sanguínea é descrita como uma consequência da deterioração do tecido linfóide associado à mucosa do intestino, vista através da depleção massiva de células T CD4⁺ presentes nesse microambiente. Consequentemente, ocorre uma perda expressiva da integridade de mucosa que leva a um aumento da permeabilidade intestinal a tais componentes (Douek, 2013; Wang & Kotler, 2014), de modo que ao alcançarem a corrente sanguínea passam a se constituir em importantes cofatores da persistência do grau de ativação, como já foi muito bem descrito na infecção pelo HIV-1 (Brenchley et al, 2006; Klatt et al, 2013), na LV (Santos-Oliveira et al, 2011) e, mais recentemente, na associação de ambas infecções (LV/HIV-1) (Santos-Oliveira et al, 2013).

Adicionalmente, o presente estudo permitiu sugerir que a translocação microbiana e sua consequente hiperativação da imunidade inata, possam ser considerados como mecanismos adicionais às frequentes recidivas da LV em pacientes coinfectados pelo HIV-1. Isso porque pacientes LV/HIV-1 recidivantes foram aqueles que mantiveram os níveis de sCD14 elevados durante todo o acompanhamento clínico, demonstrando assim, uma

manutenção da hiperativação de monócitos/macrófagos mesmo após o controle parasitário. Além disso, os níveis de citocinas pro-inflamatórias (MIF, IL-8 e IL-6) tenderam a ser maiores também neste grupo avaliado em relação aos não-recidivantes (dados não mostrados). Embora esta tendência não tenha apresentado significativa estatística, as observações corroboram com esta exacerbação da resposta inflamatória em pacientes coinfectados com frequentes episódios de reativação da LV. Em contrapartida, aqueles pacientes que não apresentaram episódios de recidivas da doença mostraram uma diminuição significativa do grau de ativação imune inata logo após o tratamento anti-*Leishmania*.

Paralelamente, quando avaliamos o grau de ativação de linfócitos B, inferido através da dosagem de IgG, IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania*, os resultados observados não foram diferentes daqueles já descritos para o *status* de ativação de células T e da imunidade inata. Dessa forma, o grau de ativação de linfócitos B diferiu entre os pacientes LV/HIV-1 recidivantes e não-recidivantes para a doença, aqui avaliados. Os pacientes recidivantes mantiveram níveis elevados de Igs durante todo o acompanhamento prospectivo, ao passo que nos pacientes não recidivantes esses valores foram sempre mais baixos. Semelhante ao que foi observado na ativação de linfócitos T, os níveis de IgG3 foram similarmente elevados entre os dois grupos nas fases iniciais do acompanhamento. Porém, de forma interessante, os pacientes não recidivantes foram aqueles que demonstraram uma diminuição significativa desses valores nos períodos posteriores ao tratamento. Esse resultado corroborou com a hipótese de que essa subclasse de IgG possa se constituir em um possível biomarcador de manutenção da remissão clínica em leishmanioses (Fagundes-Silva et al, 2012). As IgGs são produzidas em resposta às proteínas antigênicas do parasito, e seu declínio após a terapia e cura clínica é presumidamente devido à ausência do estímulo antigênico. Dessa forma, manter os níveis dessas subclasses de IgG elevados após o tratamento anti-*Leishmania* pode apontar não só falha terapêutica como também, possíveis episódios de recorrências da LV (Bhattacharyya et al, 2014), sobretudo em pacientes coinfectados pelo HIV-1.

Diante de todos os resultados até aqui discutidos, pode-se dizer que pacientes de associação LV/HIV-1 vivenciam um contínuo círculo vicioso.

Nesses pacientes, a intensa imunossupressão resultante da manutenção do prejuízo da reconstituição imunológica, pode levar a uma maior predisposição às recidivas da LV (Cota et al, 2011; Okwor & Uzonna, 2013), como pôde ser observado para os pacientes LV/HIV-1 recidivantes. Ao mesmo tempo, a infecção por *Leishmania* é vista como um potencializador do grau de ativação crônica do sistema imune em pacientes LV/HIV-1, que por sua vez pode intensificar o comprometimento da reconstituição imune desses pacientes (Santos-Oliveira et al, 2010). Esse processo pode ser agravado, uma vez que tem sido descrito que o intenso grau de ativação tende a culminar com um envelhecimento imune precoce em indivíduos cronicamente infectados (Appay et al, 2007; Gautam et al, 2013). Diante disso, nesse cenário de associação LV/HIV-1 hipotetizou-se que o grau de imunosenescência apresentado pelos pacientes avaliados, poderia ser outro importante cofator para explicar não só o comprometimento imunológico, como também as frequentes recidivas da LV nestes pacientes coinfectados pelo HIV-1. Tal fato pode ser sugerido uma vez que os níveis potencializados de ativação desempenhariam um papel crucial em promover um rápido declínio da funcionalidade do sistema imune e, assim, da eficiência da resposta efetora.

Até onde é de nosso conhecimento, um único estudo, realizado por Casado e colaboradores (2015), sugeriu uma possível associação entre o aumento da senescência em células T com a presença de um alto grau de ativação imune em pacientes infectados pelo HIV, com história prévia de LV. No entanto, este estudo foi de caráter retrospectivo, o que não permitiu aos autores avaliar a real influência desse processo sobre o estado atual desses pacientes, uma vez que no momento da admissão no protocolo de estudo, nenhuma evidência de LV ativa, ou recidiva da doença, foi observada. Além disso, este estudo não avaliou os pacientes com história de associação LV/HIV-1 de modo longitudinal, comparando-os em entre si, mas relacionando a casuística analisada apenas com pacientes mono infectados pelo HIV-1, que apresentavam resposta imune discordante à TARV.

No presente estudo, os pacientes LV/HIV-1 apresentaram altos percentuais de linfócitos T senescentes, sobretudo na subpopulação T CD8⁺, que assim seguiram desde a fase ativa até os períodos finais do acompanhamento, quando valores mais pronunciados foram observados. Esse

resultado sugere mais uma vez que pacientes LV/HIV-1 exibem, de fato, um sistema imune cronicamente ativado, que não se altera como uso da TARV e da manutenção do tratamento anti-*Leishmania*.

No entanto, não foram observadas diferenças no que se refere ao perfil fenotípico de senescência imune entre os pacientes coinfectados recidivantes ou não, o que nos faz pensar em possíveis explicações para esse fenótipo imunosenescente ter-se apresentado de forma similar entre os grupos. Primeiramente, o tempo de acompanhamento pode não ter sido suficiente para avaliar esse fenômeno, visto que um padrão de distribuição mais heterogêneo dos pacientes LV/HIV-1 pôde ser observado apenas no período de 12 mpt. Isto sugere que, em algum momento posterior a esse período, os dois grupos avaliados poderiam vir a apresentar diferenças entre si. Outra possível explicação se baseia no fato do fenômeno de imunosenescência de células T ser um processo irreversível (Brenchley et al, 2003; Appay et al, 2007). Uma vez que ambos os grupos apresentaram um *status* altamente ativado já no início do acompanhamento, a tendência é que o fenótipo senescente acompanhe esse processo. Entretanto, o fato dos pacientes não-recidivantes terem diminuído o grau de ativação após o tratamento, não significa que imediatamente o mesmo fenômeno seria observado em termos de expressão do fenótipo CD57⁺CD27⁻. Em outras palavras, a expressão de tal fenótipo nas células T em estágio final de diferenciação não pode ser revertida, permanecendo elevada por um longo tempo.

Adicionalmente, embora o perfil fenotípico de senescência imune não tenha diferido entre os grupos avaliados, diferenças em termos de funcionalidade de células T podem existir. Essa hipótese foi levantada pelo fato do fenômeno de imunosenescência consistir em um conjunto de fatores aliado ao fenótipo de células terminalmente diferenciadas. Estas células podem apresentar um prejuízo qualitativo importante, caracterizado pela perda da capacidade proliferativa e de produção de citocinas (Brenchley et al, 2003; revisto por Chou & Effros, 2013). Além disso, de forma subjacente a esse processo, pode ser observada uma exaustão dos recursos imunes primários, com uma deficiência no *output* tímico, que leva a uma menor geração de novas células para a periferia (Douek et al, 1998; Molina-Pinelo et al, 2009) e, conseqüentemente, a presença de um repertório de células T mais restrito

(Romiti et al, 2001; Giacoia-Gripp et al, 2005). Juntos, esses fatores podem acarretar em um déficit da resposta imune efetora em indivíduos de associação LV/HIV-1, que pode se constituir em um dos principais mecanismos responsáveis pelo prejuízo no controle parasitário e, conseqüentemente, maior predisposição a recidivas entre os pacientes coinfectados recidivantes. Diante disso, estudos futuros são necessários para melhor elucidar esse processo.

Em relação à manutenção da profilaxia secundária pode-se concluir de forma preliminar que esta não foi capaz de influenciar a ocorrência de recidivas, bem como a diminuição dos níveis de ativação em pacientes LV/HIV recidivantes. Ao mesmo tempo, levanta-se a hipótese de que a manutenção do tratamento anti-*Leishmania* poderia ter um efeito benéfico naqueles casos em que o indivíduo apresenta o primeiro episódio de LV (coincidente com o grupo dos não-recidivantes), os quais apresentaram uma melhor reconstituição imunológica e parasitológica da infecção.

Finalmente, este estudo visou preencher mais uma lacuna de conhecimento no que se refere a esta entidade patológica emergente, a associação LV/HIV-1. Diferenças importantes em termos de reconstituição imune, ativação celular e *status* inflamatório foram observados entre pacientes coinfectados que se mantêm em remissão clínica da LV e aqueles com frequentes episódios de recidivas da doença. Tal fato nos permitiu sugerir uma influência expressiva desses fatores sobre os diferentes desfechos clínicos da LV em pacientes coinfectados pelo HIV-1. Dessa forma, este trabalho contribuiu para que futuramente mais estudos possam levantar possíveis biomarcadores e ferramentas que auxiliem na predição de um prognóstico de recrudescência ou controle da LV na associação LV/HIV-1.

6. CONCLUSÕES

Baseando-se em nossos recentes estudos, as principais conclusões se resumem da seguinte forma:

1. O uso de TARV foi efetivo na supressão da carga viral de HIV-1 em ambos os grupos, e para a maioria dos casos já na fase ativa da doença.

2. Na LV em atividade, o comprometimento imune é similar entre os pacientes LV/HIV-1, independentemente de ter sido o primeiro episódio de LV ou de se tratar de recidivas da doença, ou seja: ambos R e NR apresentaram uma alta carga parasitária (quantificação de DNA de *L. infantum* por PCR tempo real), altos níveis de ativação linfocitária e baixas contagens de linfócitos T CD4⁺ na periferia. Este fato deve estar relacionado aos antígenos do parasito. O que diferencia estes casos é a evolução pós-tratamento/profilaxia.

3. A maioria dos pacientes LV/HIV-1 tratados e sob profilaxia secundária passa a apresentar níveis indetectáveis (NR) ou, em alguns casos (R), níveis baixos de detecção de DNA parasitário, apontando um controle parasitário periférico logo após o tratamento anti-*Leishmania*.

4. A translocação microbiana parece ocorrer de forma mais acentuada nos pacientes recidivantes, o que por sua vez, contribui para o intenso grau de ativação de linfócitos T e de células da imunidade inata. Em consequência deste processo de ativação imune, os pacientes LV/HIV-R também mantiveram uma baixa reconstituição imunológica, devido à ausência de recuperação das contagens de células T CD4⁺. Desta forma, a manutenção do *status* imunológico deficitário é provavelmente um dos fatores que contribuem para maior suscetibilidade a reativações da LV em pacientes coinfectados pelo HIV-1.

5. Os pacientes LV/HIV-NR evoluíram com redução da ativação linfocitária, ganho de linfócitos T CD4⁺ na periferia e redução dos níveis de sCD14, indicando que houve reconstituição imune e redução da translocação microbiana.

6. Os pacientes LV/HIV-1, sobretudo aqueles recidivantes, apresentaram níveis elevados de IgG total e suas subclasses (IgG1 e IgG3) anti-*Leishmania*. No entanto, após o tratamento, apenas pacientes LV/HIV-NR apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de IgG3. Esses resultados apontam que a dosagem de IgG3 sérica pode não só se constituir em um possível biomarcador de prognóstico em pacientes coinfectados, como também que a ativação de linfócitos B pode ter uma participação importante na imunopatogênese da associação LV/HIV-1.

7. Ao longo dos 12 meses de acompanhamento houve um aumento progressivo do grau de imunosenescência, sendo que este fato ocorreu em ambos os grupos NR e R, não havendo diferenças entre eles. Diferentemente do que se esperava, a redução da ativação linfocitária observada no grupo NR não foi acompanhada por uma menor indução de imunosenescência. Esse resultado pode estar associado ao fato deste ser um fenômeno irreversível, fazendo com que pacientes LV/HIV-1 exibam um sistema imune cronicamente ativado, que não se modifica apesar do uso da TARV e do tratamento anti-*Leishmania*. Além disso, a ausência de diferenças fenotípicas associadas a senescência imune entre os pacientes R e NR não significa que diferenças em termos funcionais não possam existir.

8. Diferenças imunológicas existiram apesar de todos os pacientes LV/HIV-1 estarem em vigência da profilaxia secundária. A princípio, a manutenção do tratamento anti-*Leishmania*, apesar de se mostrar indispensável, parece não ser capaz de interferir no curso clínico daqueles pacientes que vivenciam frequentes episódios de LV. No entanto, seu uso parece trazer efeitos positivos sobre a manutenção da remissão clínica, principalmente naqueles indivíduos LV/HIV-1 que apresentam a um único episódio ativo de LV ao longo da vida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandrino-de-Oliveira P, Santos-Oliveira JR, Dorval MEC, da Costa FCB, Pereira GROL, da Cunha R V., et al. HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(August):692–7.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(2):334–59.
- Ansari NA, Saluja S, Salotra P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin Immunol*. 2006;119(3):339–45.
- Appay V, Almeida JR, Sauce D, Autran B, Papagno L. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. *Exp Gerontol*. 2007;42:432–7.
- Appay V, Rowland-Jones SL. Premature ageing of the immune system: The cause of AIDS? *Trends Immunol*. 2002;23(12):580–5.
- Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol*. 2008;214(September):231–41.
- Barata RA, Peixoto JC, Tanure A, Gomes ME, Apolinário EC, Bodevan EC, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
- Barreto de Souza V, Pacheco GJ, Silva AR, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Saraiva EM, Bou-Habbib DC. Increased *Leishmania* replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *J Infect Dis*. 2006;194(6): 846-54,.
- Bartovská Z, Beran O, Rozsypal H, Holub M. Antiretroviral treatment of HIV infection does not influence HIV-specific immunity but has an impact on non-specific immune activation. *Curr HIV Res*. 2011;9:88–94.
- Benito JM, Lopez M, Lozano S, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. CD38 expression on CD8⁺ T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20(2):227-33.
- Benito JM, Zabay JM, Gil J, Bermejo M, Escudero A, Sanchez E, Fernandez-Cruz E. Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR, and CD25 antigens. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1997;14(2): 128-135.
- Bernier R, Barbeau B, Tremblay MJ, et al. The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor-kappaB elements. *J Immunol*. 1998;160:2881-8.
- Bhattacharyya T, Ayandeh A, Falconar AK, Sundar S, El-Safi S, Gripenberg M a., et al. IgG1 as a Potential Biomarker of Post-chemotherapeutic Relapse in

- Visceral Leishmaniasis, and Adaptation to a Rapid Diagnostic Test. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014;8(10):e3273.
- Bofill M, Mocroft A, Lipman M, Medina E, Borthwick NJ, Sabin CA, Timms A, Winter M, Baptista L, Johnson MA, Lee CA, Phillips AN, Janossy G. Increased numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T cells predict the decline of CD4+ T cells in HIV-1-infected patients. *AIDS*. 1996 Jul;10(8):827-34.
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, 2014.
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, 2011.
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, 2006.
- Brenchley JM, Brenchley JM, Karandikar NJ, Karandikar NJ, Betts MR, Betts MR, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8. *2003*;101(7):2711–20.
- Brenchley JM, Price D a, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006;12(12):1365–71.
- Brenchley JM, Douek DC. The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS*. 3(3):356-61, 2008.
- Carvalho EM, Bacellar O, Barral a., Badaro R, Johnson WD. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest*. 1989;83(3):860–4.
- Carvalho EM, Badaró R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest*. 1985;76(6):2066–9.
- Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 1994;152(12):5949-56.
- Casado JL, Abad-Fernández M, Moreno S, Pérez-Elías MJ, Moreno a, Bernardino JI, et al. Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-1-coinfected patients. *HIV Med* [Internet]. 2015;16(4):240–8.
- Casado JL, Lopez-Velez R, Pintado V, Quereda C, Antela A, Moreno S. Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients under going successful protease inhibitor therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001; 20(3):202-5.
- Celesia BM, Cacopardo B, Massimino D, Gussio M, Tosto S, Nunnari G, et al. Case Report Atypical Presentation of PKDL due to *Leishmania infantum* in an HIV-Infected Patient with Relapsing Visceral Leishmaniasis. *Hindawi Publishing Corporation*; 2014;2014(May 2002):3–5.

- Chou JP, Effros RB. T cell replicative senescence in human aging. *Curr Pharm Des [Internet]*. 2013;19(9):1680–98.
- Chun TW, Engel D, Mizell SB, Ehler L a, Fauci a S. Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4+ T cells using a combination of cytokines. *J Exp Med [Internet]*. 1998;188(1):83–91.
- Connolly NC, Riddler SA, Rinaldo CR. Proinflammatory cytokines in HIV disease-a review and rationale for new therapeutic approaches. *AIDS Rev* 2005; 7:168-80.
- Costa ASA, Costa GC, de Aquino DMC, de Mendonça VRR, Barral A, Barral-Netto M, et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: A comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(6):735–9.
- Costa CHN, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(4):386–92.
- Costa DL, Rocha RL, Carvalho RM a, Lima-Neto AS, Harhay MO, Costa CHN, et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health [Internet]*. 2013;107(2):78–87.
- Cota GF, de Sousa MR, Rabello A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in hiv-infected patients: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):1–8.
- Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in theseconddecade. *Indian J Med Res* 123(3): 357-88, 2006.
- Da-Cruz AM, Machado ES, Menezes JA, Rutowitsch MS, Coutinho SG. Cellular and humoral immune responses of a patient with American cutaneous leishmaniasis and AIDS. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992;86(5): 511-2.
- Da-Cruz AM, Rodrigues AC, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Sabbaga-Amato V, Posada MP, Lindoso JA, Goto H. Alterações imunopatológicas na co-infecção HIV-*Leishmania*. *Rev Soc Bras Med Trop Suppl*. 2006; 3:75-9.
- Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. *Immunity [Internet]*. 2013;39(4):633–45.
- Del Giudice P, Mary-Krause M, Pradier C, Grabar S, Dellamonica P, Marty P, Gastaut JA, Costagliola D, Rosenthal E; French Hospital Database on HIVClinical Epidemiologic Group. Impact of highly active antiretroviral therapy on the incidence of visceral leishmaniasis in a French cohort of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*. 2002 Nov 1;186(9):1366-70.
- Demarchi IG, Silveira TG V, Ferreira ICP, Lonardonni MVC. Effect of HIV protease inhibitors on New World *Leishmania*. *Parasitol Int [Internet]*. Elsevier Ireland Ltd; 2012;61(4):538–44.
- Desai S, Landay A. Early immune senescence in HIV disease. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2010;7(1):4–10.
- Dos Santos Marques LH, Gomes LI, da Rocha IC, da Silva TA, Oliveira E, Morais MH, et al. Low parasite load estimated by qPCR in a cohort of children living

- in urban area endemic for visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012; 6(12):e1955.
- Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA. HIV preferentially infects HIV-specific CD4 T cells. *Nature*. 2002;417(6884): 95-8.
- Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage E a, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature [Internet]*. 1998;396(6712):690–5.
- Douek DC. HIV disease progression: immune activation, microbes and leaky gut. *Topics in HIV Med*. 2007;15(4):114-7.
- Douek DC. Immune activation, HIV persistence, and the cure. *Top Antivir Med [Internet]*. 2013;21(4):128–32.
- Esch KJ, Juelsgaard R, Martinez P a, Jones DE, Petersen C a. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *J Immunol [Internet]*. 2013;191(11):5542–50.
- Fagundes-Silva G a, Vieira-Goncalves R, Nepomuceno MP, de Souza M a, Favoreto S, Oliveira-Neto MP, et al. Decrease in anti-Leishmania IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol [Internet]*. 2012;34(10):486–91.
- French MA, King MS, Tschampa JM, da Silva BA, Landay AL. Serum Immune Activation Markers Are Persistently Increased in Patients with HIV Infection after 6 Years of Antiretroviral Therapy despite Suppression of Viral Replication and Reconstitution of CD4 + T Cells. *J Infect Dis [Internet]*. 2009;200(8):1212–5.
- Galvão-Castro B, Sá Ferreira J a, Marzochi KF, Marzochi MC, Coutinho SG, Lambert PH. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol [Internet]*. 1984;56(1):58–66.
- Garg R, Barat C, Ouellet M, Lodge R, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF-alpha. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(5):e441.
- Gautam S, Kumar R, Singh N, Singh AK, Rai M, Sacks D, et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2014;209:290–9.
- Giacoa-Gripp CBW, Neves I, Galhardo MC, Morgado MG. Flow Cytometry Evaluation of the T-Cell ReceptorV? Repertoire Among HIV-1 Infected Individuals Before and After Antiretroviral Therapy. *J Clin Immunol [Internet]*. 2005;25(2):116–26.
- Gioannini TL, Weiss JP. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol Res*. 2007;39(1-3):249-60.
- Giorgi JV, Lyles RH, Matud JL, Yamashita TE, Mellors JW, Hultin LE, Jamieson BD, Margolick JB, Rinaldo CR JR, Phair JP, Detels R, MULTICENTER AIDS COHORT STUDY. Predictive value of immunologic and virologic markers

- after long or short duration of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002; 29(4):346-55.
- Gomes LI, Gonzaga FM, de Moraes-Teixeira E, de Souza-Lima BS, Freire VV, Rabello A. Validation of quantitative real-time PCR for the in vitro assessment of anti Leishmanial drug activity. *Experimental parasitology*. 2012 Jun;131(2):175-9.
- Goto H, Lindoso J a L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian J Med Biol Res*. 2004;37(4):615–23.
- Goto H, Prianti MDG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009;51(5):241–6.
- Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spare is as important as what it destroys. *Nat Med*. 2006;12(3):289-95.
- Hunt PW, Cao HL, Muzoora C, Ssewanyana I, Bennett J, Emenyonu N, et al. Impact of CD8+ T-cell activation on CD4+ T-cell recovery and mortality in HIV-infected Ugandans initiating antiretroviral therapy. *AIDS* [Internet]. 2011;25(17):2123–31.
- Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, et al. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis* [Internet]. 2009;199(8):1177–85.
- Karim R, Mack WJ, Kono N, Tien PC, Anastos K, Lazar J, et al. T-cell activation, both pre- and post-HAART levels, correlates with carotid artery stiffness over 6.5 years among HIV-infected women in the WIHS. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2014;67(3):349–56.
- Karim R, Mack WJ, Stiller T, Operskalski E, Frederick T, Landay A, et al. Association of HIV clinical disease progression with profiles of early immune activation: results from a cluster analysis approach. *AIDS* [Internet]. 2013;27(November 2012):1473–81.
- Khoshdel a, Alborzi a, Rosouli M, Taheri E, Kiany S, Javadian MH. Increased Levels of IL-10 , IL-12 , and IFN- γ in Patients with Visceral Leishmaniasis. :44–6.
- Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol* [Internet]. 2013;21(1):6–13.
- Leite de Sousa-Gomes M, Nilce Silveira Maia-Elkhoury A, Maria Pelissari D, Edilson Ferreira de Lima Junior F, Martins de Sena J, Paula Cechinel M. Coinfecção Leishmania-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2011;20(4):519–26.
- Lewis GK. Role of Fc-mediated antibody function in protective immunity against HIV-1. *Immunology*. 2014;142(1):46–57.
- Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury ANS, Romero GAS, et al. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9):e3136.

- Luz KG, Tuon FF, Irma M, Duarte S, Maia GM, Matos P, et al. Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(4):393–5.
- Maia-Elkhoury ANS, Alves W a, Sousa-Gomes ML De, Sena JM De, Luna E a. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad saude publica / Minist da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica*. 2008;24(12):2941–7.
- McCune JM. The dynamics of CD4⁺ T-cell depletion in HIV disease. *Nature*. 2001;410(6831):974-9.
- Mellors JW, Griffith BP, Ortiz MA, Landry ML, Ryan JL. Tumor necrosis factor alpha/cachectin enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages. *J Infect Dis*. 1991;163: 78-82.
- Miller V, Mocroft A, Reiss P, Katlama C, Papadopoulos AI, Katzenstein T, Lunzen J, Antunes F, Phillips AN, Lundgren JD. Relations among CD4 lymphocyte count nadir, antiretroviral therapy, and HIV-1 disease progression: results from the EuroSIDA Study. *Ann Intern Med*. 1999; 130(7):570-7.
- Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Jan;3(1):36-46.
- Moir S, Fauci A. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol [Internet]*. 2009;9(4):235–45.
- Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O’Shea M a, et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med [Internet]*. 2008;205(8):1797–805.
- Molina-Pinelo S, Vallejo A, Díaz L, Soriano-Sarabia N, Ferrando-Martínez S, Resino S, et al. Premature immunosenescence in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy with low-level CD4 T cell repopulation. *J Antimicrob Chemother [Internet]*. 2009;64(3):579–88.
- Musso O, Sommer P, Drouet E, Cotte L, Neyra M, Grimaud JA, et al. In situ detection of human cytomegalovirus DNA in gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR-derived methods. *Journal of virological methods*. 1996 Feb;56(2):125-37.
- Nasi M, Pinti M, De Biasi S, Gibellini L, Ferraro D, Mussini C, et al. Aging with HIV infection: A journey to the center of inflammAIDS, immunosenescence and neuroHIV. *Immunol Lett [Internet]*. Elsevier B.V.; 2014;10–4.
- Nicodemo EL, Duarte MI, Corbett CE, Nicodemo AC, Matta VL, Chebabo R, Amato Neto V. Visceral leishmaniasis in AIDS patient. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1990; Jul-Aug;32(4):310-1.
- Okwor I, Uzonna JE. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunol Res*. 2013;56(1):163–71.
- Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol*. 1996; 50:825-54.
- Pantaleo G, Fauci AS. Apoptosis in HIV infection. *Nat Med*. 1995; (2):118-20.

- Papagno L, Spina C a., Marchant A, Salio M, Rufer N, Little S, et al. Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol.* 2004;2(2).
- Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho O a., Prata a., Silva LD a., Rabello a., Teixeira-Carvalho a., et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- γ and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- α + monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chag.* *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2006;146(1):124–32.
- Picker LJ. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18(4):399-405.
- Pintado V, López-Vélez R. HIV-associated visceral leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2001;7(6):291–300.
- Powderly WG¹, Landay A, Lederman MM. Recovery of the immune system with antiretroviral therapy: the end of opportunism? *JAMA.* 1998 Jul 1;280(1):72–7.
- Preiser W, Cacopardo B, Nigro L, Braner J, Nunnari A, Doerr HW, Weber B. Immunological findings in HIV-Leishmania coinfection. *Intervirology.* 1996;39(4):285-8.
- Quarona V, Zaccarello G, Chillemi A, Brunetti E, Singh VK, Ferrero E, et al. CD38 and CD157: A long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2013;84(4):207–17.
- Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003; 97 Suppl1:17-28.
- Romiti ML, Cancrini C, Castelli-Gattinara G, Di Cesare S, Ciaffi P, Bernardi S, et al. Kinetics of the T-cell receptor CD4 and CD8 V(beta) repertoire in HIV-1 vertically infected infants early treated with HAART. *AIDS* [Internet]. 2001;15(16):2075–84.
- Rudy BJ, Kapogiannis BG, Worrell C, Squires K, Bethel J, Li S, et al. Immune Reconstitution but Persistent Activation After 48 Weeks of Antiretroviral Therapy in Youth With Pre-Therapy CD4 >350 in ATN 061. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2015;69(1):52–60.
- Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):245-66.
- Sandler NG, Wand H, Roque a., Law M, Nason MC, Nixon DE, et al. Plasma Levels of Soluble CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection. *J Infect Dis* [Internet]. 2011;203(6):780–90.
- Santos LO, Vitorio BS, Branquinha MH, Pedroso e Silva CM, Santos a. LS, d’Avila-Levy CM. Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2013;68(2):348–53.
- Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM, Pires LHS, Cupolillo E, Kuhls K, Giacoia-Gripp CBW, et al. Case report: Atypical lesions as a sign of cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus-

- positive patient simultaneously infected by two viscerotropic *Leishmania* species. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(1):55–9.
- Santos-Oliveira JR, Giacoia-Gripp CBW, Alexandrino de Oliveira P, Amato VS, Lindoso JÂL, Goto H, et al. High levels of T lymphocyte activation in *Leishmania*-HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load. *BMC Infect Dis [Internet]. BioMed Central Ltd;* 2010;10(1):358.
- Santos-Oliveira JR, Regis EG, Giacoia-Gripp CBW, Valverde JG, Alexandrino-De-Oliveira P, Lindoso JÂL, et al. Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection. *J Infect Dis.* 2013;208:57–66.
- Santos-Oliveira JR, Regis EG, LealCá CRB, Cunha R V., BozzaPatrí PT, Da-Cruz AM. Evidence that lipopolisaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(7).
- Sauce D, Elbim C, Appay V. Monitoring cellular immune markers in HIV infection: from activation to exhaustion. *Curr Opin HIV AIDS [Internet].* 2013;8:125–31.
- Serrano-Villar S, Sainz T, Lee S a., Hunt PW, Sinclair E, Shacklett BL, et al. HIV-Infected Individuals with Low CD4/CD8 Ratio despite Effective Antiretroviral Therapy Exhibit Altered T Cell Subsets, Heightened CD8+ T Cell Activation, and Increased Risk of Non-AIDS Morbidity and Mortality. *PLoS Pathog.* 2014;10(5).
- Siewe B, Landay A. Effector and regulatory roles for B cells in HIV infection? *Autoimmunity [Internet].* 2012;45(5):348–52.
- Sinha PK, Bimal S, Singh SK, Pandey K, Gangopadhyay DN, Bhattacharya SK. Pre- & post-treatment evaluation of immunological features in Indian visceral leishmaniasis (VL) patients with HIV co-infection. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):197-202.
- Stacey a. R, Norris PJ, Qin L, Haygreen E a., Taylor E, Heitman J, et al. Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections. *J Virol [Internet].* 2009;83(8):3719–33.
- UNAIDS. *AIDS Epidemic Update 2014 - Global Report.* Disponível em: www.unaids.org. Acesso em outubro de 2015.
- Van Griensven J, Zijlstra EE, Hailu A. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: time for concerted action. *PLoS Negl Trop Dis [Internet].* 2014;8(8):e3023.
- Vandergeeten C, Fromentin R, Chomont N. The role of cytokines in the establishment, persistence and eradication of the HIV reservoir. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012;23(0):143–9.
- Villar-García J, Hernández JJ, Güerri-Fernández R, González A, Lerma E, Guelar A, et al. Effect of Probiotics (*Saccharomyces boulardii*) on Microbial Translocation and Inflammation in HIV-Treated Patients. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr [Internet].* 2015;68:256–63.
- Vivarini ÁDC, Santos Pereira R de M, Barreto-de-Souza V, Temerozo JR, Soares DC, Saraiva EM, et al. HIV-1 Tat protein enhances the intracellular growth of

- Leishmania amazonensis via the ds-RNA induced protein PKR. Sci Rep [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;5(February):16777.
- Vyas, DharaH Parul P. Atypical presentation of visceral leishmaniasis in a HIV-positive patient from a nonendemic area. J Lab Physicians [Internet]. 2011;3(2):119.
- Wada NI, Jacobson LP, Margolick JB, Breen EC, Macatangay B, Penugonda S, et al. The effect of HAART-induced HIV suppression on circulating markers of inflammation and immune activation. AIDS [Internet]. 2015;29(4):463–71.
- Wang H, Kotler DP. HIV enteropathy and aging. Curr Opin HIV AIDS [Internet]. 2014;9:309–16.
- WHO. World Health Organization, HIV/AIDS: Fact sheet n° 360, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em outubro de 2015.
- WHO. World Health Organization, Leishmaniasis: Fact sheet n° 375, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em outubro de 2015.
- Zhao C, Papadopoulou B, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. Clin Immunol. 2004;113(1):81-8.

8. ANEXOS

ANEXO A -

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

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

Instituição

Responsável:

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

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

Colaboradores/Médicos assistentes e Instituição/telefone de contato:

Nome do Voluntário:

Nome do Responsável:

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

leishmaniose sem AIDS, os pacientes também poderão fazer parte do estudo caso seja de sua vontade.

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

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

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

Esclarecimentos sobre os procedimentos e inconvenientes:

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

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

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

Todo o material retirado do meu corpo deverá ser utilizado somente para fins de diagnóstico e pesquisa. Autorizo que eles sejam guardados na FIOCRUZ ou

nas Instituições que participam desta pesquisa, para serem utilizados em futuros projetos de pesquisa após análise e aprovação de um Comitê de Ética. Os investigadores deverão, a qualquer momento, esclarecer minhas dúvidas sobre o estudo e a doença, a utilização do material biológico retirado do meu corpo e os resultados obtidos com o estudo. Os autores deverão guardar meus dados, sendo eles sigilosos e confidenciais. Os resultados poderão ser divulgados na forma de comunicação científica, mas não permito a minha identificação. A qualquer momento poderei me retirar deste estudo sem qualquer prejuízo ao meu tratamento.

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

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

Voluntário/ : _____

RG:

Responsável

assinatura

Testemunha: _____

RG:

assinatura

Investigador: _____

RG:

assinatura

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Voluntários - Pacientes

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

Instituição

Responsável:

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

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

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

Colaboradores/Médicos assistentes e Instituição/telefone de contato:

Nome _____ do _____ Voluntário:

Nome _____ do _____ Responsável:

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

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

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

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

Esclarecimentos sobre os procedimentos e inconvenientes:

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

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

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

Todo o material retirado do meu corpo deverá ser utilizado somente para fins de diagnóstico e pesquisa. Autorizo que eles sejam guardados na FIOCRUZ ou

nas Instituições que participam desta pesquisa, para serem utilizados em futuros projetos de pesquisa após análise e aprovação de um Comitê de Ética.

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

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

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

Voluntário/ : _____

RG:

Responsável

assinatura

Testemunha: _____

RG:

assinatura

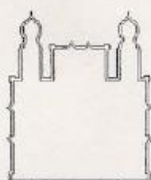
Investigador: _____

RG:

assinatura

ANEXO B –

Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do Instituto Oswaldo Cruz - IOC.



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

Rio de Janeiro, 17 de outubro de 2005.

PARECER

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

Protocolo CEP: 290/05

Pesquisador Responsável: Alda Maria Da-Cruz

Instituição: IOC

Deliberação: APROVADO COM RECOMENDAÇÃO

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


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

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

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

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


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



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


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

Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC.

Ministério da Saúde

 FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

 IPEC

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 041/2007

Protocolo 0045.0.011.009-07

1. Identificação:
Título do Projeto: "Desenvolvimento de instrumentos clínicos e laboratoriais aplicáveis aos estudos clínico-epidemiológicos, ao diagnóstico e ao monitoramento terapêutico da co-infecção HIV/*Leishmania*".
Pesquisador Responsável: Alda Maria Da-Cruz (IOC).
Instituição Responsável: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas / FIOCRUZ.
Data de Apresentação ao CEP: 31/07/2007.

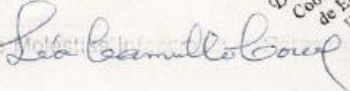
2. Sumário:
O objetivo deste projeto é identificar as características clínicas e epidemiológicas dos casos de co-infecção HIV-*Leishmania*", em áreas de alta ocorrência de ambas as doenças, bem como identificar as principais características imunopatogênicas da associação entre estes patógenos. Pretende-se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

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).
Projeto com delineamento adequado. Apresenta dois Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo um para Pacientes em Investigação de Co-infecção *Leishmania*/HIV e um segundo para Voluntários Sadios, ambos bem elaborados em linguagem acessível ao sujeito da pesquisa. Este projeto foi submetido ao PN DST/Aids – SVS / Ministério da Saúde.

4. Diligências:
Não houve.

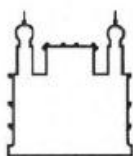
5. Parecer: APROVADO.

Data: 14 de agosto de 2007.

Assinatura do Coordenador: 

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

Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou - CPqRR.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética



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

Protocolo CEP - CPqRR nº: 33/2010

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

Pesquisadora Responsável: Glaucia Fernandes Cota

Instituição Realizadora: Hospital Eduardo de Menezes – FHEMIG

Instituição Vinculada: Centro de Pesquisas René Rachou

CAAE: xxx

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

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

Situação: PROJETO APROVADO.

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

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

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

Belo Horizonte, 17 de Janeiro de 2010.



João Carlos Prito Dias
João Carlos Prito Dias
Coordenador do CEP/SH - Comitê de Ética

Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do Hospital Eduardo de Menezes.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL EDUARDO DE MENEZES
PARECER CONSUBSTANCIADO

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

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Dra. Gláucia Fernandes Cota

ORIENTADORA: Dra Ana Lúcia Teles Rabello

DATA DE APRESENTAÇÃO AO CEP: 15/12/2010

PARECER

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

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

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

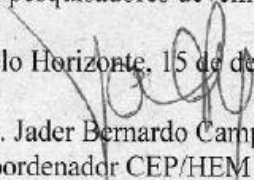
Está estruturado de forma a proteger o sujeito da pesquisa.

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

Proponho sua **APROVAÇÃO**.

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

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2010.


Dr. Jader Bernardo Campomizzi
Coordenador CEP/HEM

ANEXO C –

Immune activation and bacterial translocation: a link between impaired immune recovery and frequent visceral leishmaniasis relapses in HIV infected patients.

Maria Luciana Silva-Freitas¹

Glaucia Cota³

Carmem Giacoia-Gripp²

Alda M. Da-Cruz¹

Ana Rabello³

Joanna R. Santos-Oliveira¹

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

²Laboratório de AIDS e Imunologia – Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³Laboratório de Pesquisas Clínicas e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias – Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil.

³Hospital Eduardo de Menezes – Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais-FHEMIG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Corresponding author:

Abstract

High incidence of visceral leishmaniasis (VL) occurs in HIV-1 co-infected patients. Although highly active antiviral therapy (HAART) has been associated with a decrease of VL/HIV coinfection incidence, it does not prevent the relapses episodes in coinfecting patients. Previous studies have pointed that leishmaniasis worsens the immunosuppression of HIV and is a cofactor to the heightened activation status in VL/HIV-1 patients despite successful HAART and anti-*Leishmania* therapies. The maintenance of immune activation, due to microbial translocation or parasite persistence in bone marrow may contribute to the impairment of effector T cell response and frequent relapses. In addition, such activation has been associated with an exhaustion of immune system in HIV-1 patients. Thus, our aim was to investigate whether VL/HIV-1 patients presenting a single episode of VL throughout life have different functional status (activation and senescence) of T cells in comparison to those that suffer frequent relapses. VL/HIV patients were grouped in: non-relapsing (NR, n=6) and relapsing (R, n=11). Both groups were followed from the active phase of VL up to 12 months post-treatment (mpt). They are under ART and in use of secondary prophylaxis with B amphotericin (50 mg biweekly), since the end of VL therapy. Healthy subjects (n=12) were included. CD4⁺T-cell counts, cellular activation degree (CD38⁺HLA-DR⁺), senescence (CD57⁺CD27⁻), and soluble factors associated with microbial translocation and anti-*Leishmania* immunoglobulins detection were performed. During active VL, both groups presented similar levels in all the parameters evaluated, including the parasite load. However, at 6 and 12 mpt, NR group showed a gain of CD4⁺T cells in the periphery (p<0.05; p<0,001), a reduction of lymphocyte activation, and lower soluble sCD14 levels compared to R group, indicating that there were immune reconstitution and reduction of microbial translocation. In contrast, R group maintained high levels of cellular activation and soluble sCD14, not presenting gain of CD4⁺ T lymphocytes. This maintenance of degree of immune activation and consequently of the deficient immune status is probably one of the factors that contribute to increased susceptibility to reactivation of VL in this group. The viral load remained low or undetectable without correlation with activation levels. Both groups showed similar percentages of senescent CD4⁺T and CD8⁺T cells, that were higher in relation to the controls (p<0.05). In addition, high levels of IgG1 and IgG3 anti-*Leishmania* were observed in the R group, especially IgG3. Finally, a significant negative correlation was found between the percent of activated CD8⁺T lymphocytes and the CD4⁺T cells counts, which also negatively correlated with sCD14 levels. The worsen capability of NR group to downmodulate the activation levels in comparison with NR group, could be related to any functional impairment of effector response that was shaped at each relapses. Furthermore, the secondary prophylaxis does not seem to be able to influence the occurrence of relapses, as well as to decrease the activation levels in relapsing patients.

Introduction

The increasing frequency of HIV-associated visceral leishmaniasis (VL/HIV) has become a significant problem in east Africa, Brazil and India. Brazil presents the highest number of co-infection cases in South American continent, which accounts for 9.3% of notified cases of visceral leishmaniasis (VL) (OPAS, personal communication). The HIV epidemic has modified the epidemiology and the clinical outcome of VL. HIV and *Leishmania* infect the same host cell, the macrophage, and both diseases profoundly impair the immune mechanisms involved in the control of these infections (1). Consequently, the VL/HIV outcomes are poor. Compared to VL patients without HIV/AIDS the main differences are: lower and slow clinical response to treatment and higher frequency of drug toxicity, relapses and mortality (1-4).

The overall immunological reconstitution observed after highly active antiviral therapy (HAART) introduction, at least in countries where is available, has reduced the opportunistic infections, including the incidence of *Leishmania*/HIV coinfection (5-8). Besides the decrease of viral-mediated immune activation, the marked increase in the CD4⁺ T cell counts probably also accounted to ameliorate the effector mechanisms associated to parasite control (8-9). Interestingly, there are *in vitro* evidences that antiretroviral, as protease inhibitors class (PIs), presents an inhibitory effect on the evolutionary forms of the *Leishmania (L.) infantum* (10-11). This adds another factor that could contribute to the decline of new VL cases in HIV-infected people under HAART, but more studies in cohorts of VL/HIV coinfecting patients are required to elucidate this issue.

Despite reducing new VL cases in HIV/AIDS patients, HAART did not prevent the relapses episodes (2), which still challenge the clinical management. Although, is easier to observe VL relapses in individuals with uncontrolled HIV replication and/or poor immune recovery (12-14), the frequency of VL relapses in VL/HIV patients receiving HAART is still high (2, 7-8, 15). The parasite reactivation occurs even in patients with a good response to HAART, i.e., undetectable viral load and slight CD4⁺ T cell count augment (16-17). Earlier studies soon after HAART-era (18) did not show significant differences between these virologic and immunologic parameters when compared relapsing and no-

relapsing patient under HAART. This fact has led to speculate that HAART does not seem to prevent recurrences, especially in those individuals with previous VL episodes. In this context, recent meta-analysis reviewed by our group (2) pointed three relevant predictive factors for relapses: 1. previous episodes of disease; 2. low CD4⁺ T counts nadir and 3. the lack of recovery of these cells after first VL episode.

Early results have shown that VL contributes to worsen the immunosuppression of AIDS, since both share similar pathogenic features. Coinfected patients under HAART and after anti-*Leishmania* treatment, remain with low levels of CD4⁺ T cell counts despite undetectable plasma viral load (17, 19). In addition, the quality of *Leishmania*-specific immune response may remain impaired in *Leishmania*/HIV patients under HAART as reduced T cell proliferative capacity and deficient interferon (IFN)- γ production (20-21). Consequently, the deficient parasite control can favor the spread of *L. infantum* to unexpected sites and the appearance of atypical clinical frames. In this scenario, amastigotes have been recovered from skin (21), gut-associated lymphoid tissues (GALT) (22-23).

There are strong evidences that chronic cellular activation is a crucial immunopathogenic mechanism not only in HIV infection but also in VL (24-27). In consequence, VL/HIV coinfecting patients present potentiated levels of activated CD38⁺ on CD8⁺ T lymphocytes (19) as well as elevated levels of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 β and macrophage inhibitory factor migration (MIF) (28-29). Unexpected, heightened cellular activation status still remain despite successful control of viral and parasite load (28) due to HAART and anti-*Leishmania* therapy, respectively. Microbial translocation or even the parasite persistence in bone marrow or lymphoid organs have been pointed as possible related factors to maintenance of immune activation (28, 30). In this scenario, there are strong evidences that anti-*Leishmania* secondary prophylaxis help keeping clinical remission of VL in HIV infected patients (2, 3) reinforcing the idea that parasite persistence in the lymphoid organs is the primary source of the relapses. Our hypothesis is that controlling parasite load could help to withdraw one of the branches that contribute to augment the

cellular activation in *Leishmania*/HIV coinfection. In turn, it would bring benefits to the effector immune response, diminishing the occurrence of relapses.

Another consequence of immune activation is the accelerated and premature aging of immune system (31-33) even in HIV infected patients with viral load suppression (33). It is characterized by an exhaustion of immune primary resources, decreased thymic output, loss of replicative capacity of effector cells and accumulation of terminally differentiated cells; similar to what occurs in healthy elderly subjects (34-35). Then, coinfecting patients may experience a potentialization of senescence degree, providing additional factor for decrease effector immune response to *Leishmania* antigens and contribute to frequent relapses.

Previous results of our group have shown that VL/HIV-AIDS patients display high levels of cell activation during the clinical remission of leishmaniasis and HAART (19). However, it is crucial to determine whether parasite load control due to anti-*Leishmania* secondary prophylaxis in patients under HAART can favor the T-cell immune reconstitution and to diminish the activation levels, which together can help to prevent further relapses.

The aim of this study is to determine the functional status (activation and senescence) of T-cells in patients that maintain the VL in remission as well as establish immunological parameters that could be related to relapsing VL course. For this purpose VL/HIV patients under HAART and in use of secondary prophylaxis with amphotericin B were prospectively followed for 12 months

Methods

Study design and participants

This study represents an immune evaluation performed in 18 *Leishmania*-HIV co-infected patients involved in a prospective cohort study carried out in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, from February 2011 to March 2013. VL/HIV coinfecting patients were separated according to the number of VL episodes: those who had only one episode throughout life (Non-relapsing group-NR) and those presenting more than one VL episode, either previously or during the prospective follow up (relapsing group-R). HIV-infected patients without history

of VL (n=16) and healthy subjects for both infections (n=12) were also included in this study.

VL diagnosis was confirmed by parasitological exam of bone marrow aspirate in all patients. Clinical evaluation and a panel of the immune response including cellular activation status and senescence degree were performed before the VL treatment and then every two months for one year. Approval for this study was obtained from the Ethical Review Board of HEM-FHEMIG and from Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR-FIOCRUZ). Patients with clinical symptoms and parasitological confirmation of active VL were included in the study only after appropriate informed consent was obtained. First-line treatment of VL for HIV-infected patients was intravenous amphotericin B deoxycholate for 4 weeks. Liposomal amphotericin at a total dose of 20mg per Kg was reserved for patients over the age of 50 years or suffering from kidney failure, according to recommendations of the Ministry of Health of Brazil at that time. After VL treatment, for all patients with CD4 lymphocyte counts less than 350 cells/mm³, amphotericin B secondary prophylaxis was offered every two weeks. The spleen was measured at its greatest extent from the left costal margin in the left midclavicular line, toward the splenic tip. Splenomegaly was defined by the presence of any palpable spleen and, during follow-up; any difference of 2 cm or more in palpation of the spleen was considered worsening of the splenomegaly. VL relapse was suspected in the presence of one of the following criteria, since confirmed by a positive parasitological test (direct exam or culture) in specimen obtained by bone marrow aspirate: a) reemergence of fever or b) worsening of a cytopenia (defined by a reduction of 50% or more in platelet or leucocytes counts or decrease of 2g% or more in hemoglobin level) or c) increase of splenomegaly.

Immunologic and Virologic Assessments

Absolute T-lymphocytes counts on 50 µl whole blood were performed using BD Truecount™ reagent kit (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Cell surface staining used monoclonal antibodies specific for CD45, CD3, CD4 and CD8 conjugated to PerCP, FITC, APC and PE, respectively. Samples were acquired using a FACSCalibur and analyzed with Multiset software (BD). The results were expressed as the number of cells per cubic millimeter (cells/mm³).

Plasma HIV RNA levels were measured for all VL/HIV coinfecting patients by real time quantitative PCR (RT-PCR) (Abbott, Des Plaines, IL, EUA), according to the manufacturer's recommendations. The detection range was from 40 to 10.000.000 RNA copies/mL plasma. Assays whose results were below 40 copies per mL were expressed as undetectable or below the detection limit.

Leishmania Parasite load Assessment

Total DNA from peripheral blood of patients was extracted using the QIAamp DNA Blood mini-kit (Qiagen GmbH; Hilden, Germany). Two independent assays for the detection and quantification of *Leishmania* spp. and human DNA were performed using the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). For the *Leishmania* assay, a TaqMan real time PCR, was performed using as target DNA, the small-subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene, which is conserved among all *Leishmania* species. It consisted of the primers LEIS.U1 (5'-AAGTGCTTTCCCATCGCAACT-3') and LEIS.L1 (5'-GACGCACTAAACCCCTCCAA-3'), designed to amplify a 67-bp fragment and the fluorogenic probe LEIS.P1 (FAM 5'-CGGTTCGGTGTGTGGCGCC-3'TAMRA), as described by Wortmann et al. (2002)(36). The protocol described by Gomes and others (2012)(37) was applied. For the human assay, the *ACTB* reference gene was used as target and the primers Aco1 and Aco2 (38), which generate 120-bp fragments, were used in this assay. The reaction mixtures contained 12.5 µL of Syber® Green PCR Master Mix 2X (Life Technologies), 0.1 µM of each primer, and 3 µL of DNA template in a final volume of 25 µL. The cycling parameters were universal, and the melting analysis was conducted based on the parameters of the StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Standard curves were prepared for each assay using known quantities of pCR-4 TOPO vector (Life Technologies) containing the cloned human gene (*ACTB*; 120 bp) and the 67 bp *L. infantum* SSU rRNA fragment. The recombinant plasmids were serially diluted 1:10 to create each standard curve. The quality parameters of the standard curves, including PCR efficiency, linear dynamic range and correlation coefficient, were obtained by software analysis and were accurate and similar to obtained by previous studies from our group (37) (39). The parasite load was expressed by the *Leishmania* DNA load (relative copy number of the 67 bp SSU rRNA

fragment) normalized against the reference gene *ACTB*, according to Overbergh and others, 1999 (40). *ACTB* copy numbers for the target samples were divided by the highest *ACTB* value obtained in the experiment, resulting in a correction factor used for normalization.

Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) and cytofluorometric assays

PBMCs were obtained by centrifugation in a gradient of Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, USA) and used for cytofluorometric assays. PBMCs were labeled with the following human monoclonal antibodies: anti-CD4 PerCP and anti-CD8 APC (to lymphocyte subpopulation), anti-CD38 PE and anti-HLA-DR PerCP (to cellular activation), anti-CD57 FITC and anti-CD27 PE (to replicative senescence). All antibodies were purchased from BD Biosciences (BD,USA). At least 20.000 events in the lymphocyte gate were acquired on a FACSCalibur and analyzed with CellQuest™ software (BD Biosciences). The analysis region was established by first gating on the CD3⁺ T lymphocytes, which was based on forward scatter vs fluorescence dot plot. After that, the results were expressed as the percentage of activated T cells on CD3⁺ T lymphocytes (CD38⁺HLA-DR⁺CD4⁺ and CD38⁺HLA-DR⁺CD8⁺ Tcells) and senescent T cells (CD57⁺CD27⁻CD4⁺ and CD57⁺CD27⁻CD8⁺ T lymphocytes).

Quantification of Lipopolysaccharide (LPS), Soluble CD14 (sCD14)

Plasma samples were stored at -70°C prior to analysis. The samples were diluted in endotoxin-free water, and LPS levels were quantified using a commercial assay kit (Limulus amoebocyte lysate QCL-1000; Cambrex, Milan, Italy). The results were expressed as picograms per milliliter, and the sensitivity level was 10pg/mL. Soluble CD14 levels were quantified by ELISA with the Quantikine Human sCD14 Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, Maryland, USA); the results were expressed as nanograms per milliliter, and the minimum detection limit was 125pg/mL.

Anti-Leishmania Immunoglobulins detection

An ELISA was performed as previously described (Fagundes-Silva et al 2012). Briefly, *L. (L.) infantum* promastigote (MHOM/BR/1974/PP75) soluble antigen (40 µg/mL) was used to coat a polystyrene flat-bottom microtitre plate (Nuncimmuno Plate, Roskilde, Denmark) and incubated at 4°C overnight in a humidified chamber. After washing, diluted sera (1:50) were added and incubated at room temperature. After six washes, the plate was incubated with diluted peroxidase-conjugated mouse monoclonal anti-human IgG (1:1000) (Invitrogen, San Francisco, CA, USA) and diluted monoclonal anti-human IgG1 (1:200) and IgG3 (1:400) (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA). After washing, the enzymatic reaction was revealed and a stop solution was used to stop the reaction. The absorbance was measured with a Microplate reader Benchmark (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at 492 nm and expressed as ELISA index (EI).

Statistical analyses

Continuous variables were expressed as median and interquartile ranges. Comparisons were analyzed using unpaired Student's T-tests in normally distributed variables and Wilcoxon tests in paired variables with skewed distributions. Spearman test was used for correlation analysis and chi-square was used to compare categorical variables. Statistical analyses were performed by using SPSS® version 16 and GraphPad Prism software (version 5.0, San Diego, CA, USA).

A paired test (Kruskal Wallis) was used since the same patients are seen when evaluating the data prospectively. However, to evaluate the NR (no relapsing) and R (relapsing) groups was employed a non-paired test (Man-Whiney).

Results

Clinical characteristics and evolutionary course of VL/HIV patients

Demographic characteristics and clinical evolution of all studied patients are shown in Table 1. The mean patient age was 37.5 ± 0.7 years, fourteen were men (78%) and half of them (nine patients) had already experienced a prior VL

episode. In 15 patients the diagnosis of VL occurred before the diagnosis of HIV infection and most of them (14 patients) had already experienced highly active antiviral therapy (HAART). However, out of ten patients using HAART for more than 3 months, only 7 were taking on a regular basis.

In order to study the factors related to VL relapse, patients were grouped according to the number of VL episodes lifelong: those who had only one (NR group, 6 patients) and those presenting more than one VL episode (R group, 12 patients). Patients presenting a relapsing evolution had a lower normalization rate of clinical and laboratory parameters at 3 months after treatment ($p=0.02$); a lower *Leishmania* clearance rate after anti-*Leishmania* treatment ($p=0.01$) and a lower CD4 lymphocyte T count at 12-month follow-up in comparison to patients presenting only one VL episode lifelong.

Also, relapsing patients presented a higher activation rate on CD4 and CD8 lymphocyte T cell, a higher level of soluble CD14 and anti-*Leishmania* IgG3 at 12-month follow-up. Interestingly, and possibly related to this unfavorable evolution, we observed longer time between HIV and LV diagnoses in relapsing group in contrast to non-relapsing group (median 51 *versus* 5 months, $p=0.05$). Similarly, the HIV infection diagnosis had taken place long before in relapsing group than in no relapsing group: median 103 (95%IC 29.5-141) *versus* 5 (95%IC 3.5-21.25) months ($p = 0.007$).

Several episodes of VL impair the immune reconstitution degree in VL/HIV patients, independently of virological and parasitological load

All coinfecting patients presented low values of CD4⁺ T cells during active phase (median: 98 cells/mm³; IQR: 63 – 159 cells/mm³) in comparison to HIV monoinfected patients (median: 377 cells/mm³; IQR: 222 – 450 cells/mm³) (**figure 1A**). In a prospective evaluation most of them remained with less than 350 CD4⁺ T cells/mm³, which was the criteria used for the introduction and maintenance of secondary prophylaxis in this study. However, non-relapsing VL/HIV patients (NR) presented a significant gain of CD4⁺ T cell markedly after six months post-treatment prospective follow-up ($*p<0.05$) compared to VL/HIV relapsing group (**figure 1B**). On the other hand, VL/HIV-R, kept the same values observed in the active phase of the disease (**figure 1B**).

The HIV viral load did not seem to be related to CD4⁺ T cells depletion, since it was low or undetectable in 13 out of 18 coinfecting patients, already in the active phase of VL or regardless of NR or R group (**supplementary table**). In addition, recurrences occurred independently of viral load, since some patients remained with undetectable HIV RNA copies at the moment of relapse, as well as, by the end of 12 months follow-up (**n=4, supplementary table**). Besides, VL/HIV-NR presented undetectable parasite load soon after anti-*Leishmania* treatment. Excepting one patient, these undetectable levels were maintained up to 12 months follow-up. In relation to VL/HIV-R, 5 out of 9 evaluated patients still presented detectable parasites in the subsequent periods to treatment (**supplementary table**), suggesting that parasite persistence at the end of treatment may indicate increased risk of future relapses.

Immune activation degree in the VL/HIV patients seems to be related with the number of VL episodes

In a previous transversal study of VL/HIV patients (19, 28), multivariate analysis pointed “leishmaniasis disease” but not parasite load, and microbial translocation as the main risk factors associated with activation status.

Percentages of activated T lymphocytes were equally augmented in both VL/HIV-NR and -R groups in the early stages of the follow up. As expected, CD8⁺ T lymphocytes (**figure 2B**) displayed higher activation levels than CD4⁺ T (**figure 2A**). VL/HIV-NR patients presented lower levels of cellular activation on CD8⁺T and CD4⁺T cells by the end of clinical follow up ($p<0.05$). At sixth month, VL/HIV-NR showed a trend towards decreased activation levels, but a significant reduction was seen at 12 months post-treatment compared to VL/HIV-R group (** $p<0.01$).

In similar way, relapsing group showed higher sCD14 levels when compared to non-relapsing group during all phases of follow-up, and such difference was already significant at post-treatment ($*p<0.05$) (**figure 3A**). As expected, the sCD14 levels were positively correlated with LPS levels in all phases of evaluation ($p<0.001$; $r = 0.42$) (**figure 3C**). Also, a significantly negative correlation was observed for the absolute CD4⁺ T cells counts (**figure 3B**). A high degree of innate activation is also related to the immune impairment, once the release of sCD14 is dependent of LPS-macrophage activation.

Reduction of IgG3 anti-Leishmania levels could predict the maintenance of clinical remission in VL/HIV patients

As observed for T cells and macrophage activation status, B lymphocyte activation was evaluated by quantitation levels of anti-*Leishmania* immunoglobulin G (IgG) and its subclasses (IgG1 and IgG3). VL/HIV-R presented high levels of anti-*Leishmania* IgG and IgG1 compared to VL/HIV-NR throughout the study (**figure S1**). On the other hand, anti-*Leishmania* IgG3 levels were similarly elevated between both groups in the early stages of follow-up, but significantly decreased in non-relapsing group in comparison to relapsing patients after six and 12 months post-treatment (* $p < 0.05$) (**figure 4**).

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

Considering that the chronic cellular activation leads to a state of immune exhaustion, and that this phenomenon may contribute to the effector response impairment and consequently to the frequent relapses, it was performed the analysis of immunosenescence degree in VL/HIV patients along the prospective follow-up. The CD57⁺CD27⁻ phenotype on CD8⁺ and CD4⁺ T cells is found in senescent cells. In general, coinfecting patients showed high percentages of senescent CD8⁺ T lymphocytes during all phases of follow-up. These values were higher than those observed to healthy controls of the same age (median: 4.2%; IQR: 2.6 – 10.1%) and with a trend towards increase by the end of follow up (**figure 5B**). Despite of lower percentages, this same result was observed in the subpopulation of CD4⁺ T lymphocyte senescent (**figure 5A**). However, the percentages of senescent T lymphocytes were elevated in both VL/HIV-NR and -R group without any difference between them (data not shown).

These results suggest that VL/HIV patients who experienced VL relapses previously or during the clinical follow-up showed different immunological parameters of those with a single episode of active disease, even though both are with controlled viral load and under secondary prophylaxis.

Discussion

Earlier cross-sectional studies had pointed *Leishmania* infection as a cofactor for heightening the activation status in HIV patients and this finding was

independent of the viral or parasite load (19, 28). The present study confirmed that coinfecting patients with active VL (NR or R group) presented low CD4⁺ T cell counts, high levels of cellular activation and microbial translocation and elevated parasitaemia. Unlike other studies that evaluated a single point (30), herein, the prior history of VL, the current immunological state of the patient at each visit and the final outcome therapy under secondary prophylaxis were taken into account. Our data demonstrated that after 12 months follow-up under anti-*Leishmania* prophylaxis use, coinfecting patients experiencing more than one episode of the disease (R, relapsed) kept a high degree of chronic immune system activation, besides low immune reconstitution and high levels of plasmatic microbial translocation products. On the other hand, those who have a single episode of VL lifelong (NR, non-relapsed) showed a significant gain in the lymphocyte CD4⁺ T cell counts, decreased the activation levels and microbial translocation after treatment.

To understand the rationale underlying the frequent episodes of VL in the R group is fundamental to design preventive strategies. In this connection, our group had reported that diminished levels of cellular activation were stably maintained during the remission phases of a coinfecting patient 12 months prospectively followed up (21). However, reactivation episodes were again marked by increased activation status along with progressively lower levels of specific IFN- γ to parasite antigens (21). Thus, these results have been suggested that repetitive VL relapses may worsen the effector immune response and consequently its ability to control parasites as a vicious circle. It reinforces the importance of epidemiological surveillance to the early diagnosis and treatment of VL.

At the beginning of the present follow-up, the impairment of immunological parameters was similar in both NR and R group, indicating that parasite antigens released during active disease works as a cofactor for the depression of the immune response. Interestingly, these groups evolved in a different way after treatment followed by secondary prophylaxis. The longer exposure to HIV infection, as well as, longer period between HIV diagnostic and the first active VL episode, as observed in R in comparison to NR group, seems to be a crucial factor predisposing *Leishmania* recurrences of disease. This could be one of

the reasons related to the maintenance of high levels of activation with consequent ongoing immune compromising.

Herein, the NR group displayed a significant decrease in the activation degree after 6 and 12 mpt. This evolution cannot be assigned only to the *Leishmania* infection control, because R group also reduced the parasite load after anti-*Leishmania* treatment and secondary prophylaxis prospectively over 12 months. Despite this reduction, only four out of 11 coinfecting patients from R group still have low but detectable *Leishmania* kDNA copy numbers in peripheral blood at the end of follow-up. This observation reinforces the issue that low- and continuous level of *Leishmania* parasitaemia can occur in treated patients, in spite of an adequate clinical response to specific therapy. Such fact can lead to a clinical condition characterized by alternating asymptomatic and symptomatic states (6) (7). Considering that parasite control did not prevent VL relapse in R group, it is plausible to propose that other factors could be contributing to the maintenance of high levels of activation in those group.

The persistent activation in HIV infection, and also in VL/HIV coinfection, have been associated with the microbial translocation from lumen origin into the bloodstream (24, 27, 28). In fact, relapsed VL/HIV patients showed higher levels of sCD14 that were positively correlated to the high levels of plasma LPS, suggesting that this molecule is biologically active. In consequence, such activation of monocytes/macrophages via sCD14 levels contributes not only to the heightened degree of systemic activation, but also to the impairment of immune reconstitution, since sCD14 levels were negatively correlated with CD4⁺ T counts. These data indicate the microbial translocation as an additional factor to explain the frequent VL relapses in patients with HIV infection, once only relapsing patients persisted with high levels of sCD14 and LPS after viral and parasite control.

In this scenario, the clinical condition of VL/HIV patients can be aggravated by the consequences of immune activation, referred as an accelerated aging of immune system. Herein, it was hypothesized that the boosted levels of chronic activation in VL/HIV coinfection could play a crucial role in promoting a rapid decline of the immune system competence, making the immunosenescence an additional factor contributing to the recurrences of VL in HIV-infected patients.

In fact, coinfecting patients showed high percentages of senescent CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes which reflects a chronically activated immune system, which does not change despite the use of ART and maintenance of anti-*Leishmania* treatment. This result is in accordance with what was observed in VL/HIV coinfecting patients from Mediterranean basin, but differently herein all the cases were observed prospectively (30). However, senescence degree did not differ between relapsed or non-relapsed patients, suggesting that is not only the quantitative accumulation of terminally differentiated cells that matters. Indeed, immunosenescence phenomenon is related with the lower capacity to respond to new antigens and an exhaustion of primary resources, which can lead to loss of viral load control and progression towards HIV disease (34, 35). Considering that CD4⁺ T cell count were negatively correlated with cellular activation and that it is the primary cause of immunosenescence (data not shown), two possibilities to explain the deficient T cell reconstitution may be raised: 1) deficit on T lymphocytes functionality, through the proliferative capacity impairment and cytokine production under parasite or viral antigens stimuli; 2) decreased thymic output or failure mobilization of peripheral T cell compartments. Since the absence of absolute recovery of CD4⁺ T cell after primary VL is an important predictor of relapse in patients infected with HIV (2), ongoing studies with this cohort of patients are addressing these points.

Concurrently to T lymphocytes involvement on the co-infection pathogenesis, a high degree of B cell activation may also be inferred, since elevated levels of IgG anti-*Leishmania* were observed, particularly in VL/HIV relapsed patients. Interestingly, IgG3 levels decreased among NR patients after VL treatment and remained so until the end of follow-up, very similar to what was observed in the CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes activation levels. This finding corroborates what has been described in the tegumentary form of leishmaniasis (41), suggesting IgG3 as a possible clinical remission marker also in the VL.

In conclusion, anti-leishmanial prophylaxis could have an impact in reducing *Leishmania* parasitaemia, and seems to bring some beneficence to co-infected patients preventing relapses especially in those who never presented VL before. However, in relapsing patients other mechanisms can contribute to the sustained impaired immune response, as cells activation due to microbial

translocation or T cell compartment exhaustion. These findings bring additional insights for understating mechanisms underlying relapses and reinforce how important early diagnosis and treatment are in reducing the immune system compromising.

References

1. Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury ANS, Romero GAS, et al. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9):e3136.
2. Cota GF, de Sousa MR, Rabello A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Jun;5(6):e1153.
3. Cota GF, de Sousa MR, Fereguetti TO, Rabello A. Efficacy of anti-leishmania therapy in visceral leishmaniasis among HIV infected patients: a systematic review with indirect comparison. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 May 2;7(5):e2195.
4. Cota GF, de Sousa MR, de Freitas Nogueira BM, Gomes LI, Oliveira E, Assis TS, et al. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. *Am J Trop Med Hyg*. 2013 Sep;89(3):570-7.
5. De la Rosa R¹, Pineda JA, Delgado J, Macías J, Morillas F, Martín-Sánchez J, Leal M, Sánchez-Quijano A, Lissen E. Influence of highly active antiretroviral therapy on the outcome of subclinical visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis*. 2001 Feb 15;32(4):633-5.
6. Del Giudice P¹, Mary-Krause M, Pradier C, Grabar S, Dellamonica P, Marty P, Gastaut JA, Costagliola D, Rosenthal E; French Hospital Database on HIV Clinical Epidemiologic Group. Impact of highly active antiretroviral therapy on the incidence of visceral leishmaniasis in a French cohort of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*. 2002 Nov 1;186(9):1366-70.
7. Cruz I¹, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*. 2006 Mar;123(3):357-88.
8. Alvar J¹, Aparicio P, Aseffa A, DenBoer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Apr;21(2):334-59.
9. Okwor I¹, Uzonna JE. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunol Res*. 2013 May;56(1):163-71.

10. Savoia D¹, Alice T, Tovo PA. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*. 2005 Jul;26(1):92-4.
11. Santos LO, Vitorio BS, Branquinha MH, Silva CMP, Santos ALS, d'Avila-Levy CM 2013. Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother* 68: 348-353.
12. Mira JA¹, Corzo JE, Rivero A, Macias J, De Leon FL, Torre-Cisneros J, Gomez-Mateos J, Jurado R, Pineda JA. Frequency of visceral leishmaniasis relapses in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Mar;70(3):298-301.
13. Silva ED, Andrade LD, Araújo PS, Silveira VM, Padilha CE, Silva MA, Medeiros ZM. Case study of a patient with HIV-AIDS and visceral leishmaniasis co-infection in multiple episodes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013 Nov-Dec;55(6):425-8.
14. Standaert D, Laurent F, Jonckheere S, Scheiff JM, Vandercam B, Yombi JC. Relapsing visceral leishmaniasis in a HIV-1 infected patient with advanced disease. *Acta Clin Belg*. 2013 Mar-Apr;68(2):124-7.
15. Cota GF¹, de Sousa MR², de Mendonça AL³, Patrocínio A³, Assunção LS³, de Faria SR³, Rabello A⁴. *Leishmania*-HIV co-infection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Apr 17;8(4):e2816.
16. Casado JL¹, Lopez-Velez R, Pintado V, Quereda C, Antela A, Moreno S. Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001 Mar;20(3):202-5.
17. Alexandrino-de-Oliveira P¹, Santos-Oliveira JR, Dorval ME, Da-Costa Fd, Pereira GR, da Cunha RV, Paniago AM, Da-Cruz AM. HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Aug;105(5):692-7.
18. Villanueva JL¹, Alarcón A, Bernabeu-Wittel M, Cordero E, Prados D, Regordán C, Alvar J. Prospective evaluation and follow-up of European patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 coinfection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000 Oct;19(10):798-801.
19. Santos-Oliveira JR¹, Giacoia-Gripp CB, Alexandrino de Oliveira P, Amato VS, Lindoso JÂ, Goto H, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Grinsztejn B, Morgado MG, Da-Cruz AM. High levels of T lymphocyte activation in *Leishmania*-HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load. *BMC Infect Dis*. 2010 Dec 20;10:358.
20. Da-Cruz AM¹, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho Z, Machado ES, Coutinho SG. Cellular immune responses to *Leishmania braziliensis*

in patients with AIDS-associated American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000 Sep-Oct;94(5):569-71.

21. Santos-Oliveira JR¹, Da-Cruz AM, Pires LH, Cupolillo E, Kuhls K, Giacoia-Gripp CB, Oliveira-Neto MP. Atypical lesions as a sign of cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus-positive patient simultaneously infected by two viscerotropic *Leishmania* species. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Jul;85(1):55-9.
22. Gómez Senent S, Adan Merino L, Mora Sanz P. [Kala azar with gastric involvement]. *Gastro enterol Hepatol.* 2009 Mar;32(3):176-7.
23. Luz KG¹, Tuon FF, Duarte MI, Maia GM, Matos P, Ramos AM, Nicodemo AC. Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010 Jul-Aug;43(4):393-5.
24. Brenchley JM¹, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006 Dec;12(12):1365-71.
25. Santos-Oliveira JR¹, Regis EG, Leal CR, Cunha RV, Bozza PT, Da-Cruz AM. Evidence that lipopolisaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Jul;5(7):e1198.
26. Peruhype-Magalhães V¹, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, Figueiredo RM, Guimarães-Carvalho SF, Ferrari TC, Van Weyenbergh J, Correa-Oliveira R. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol.* 2006 Oct;146(1):124-32.
27. Klatt NR¹, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol.* 2013 Jan;21(1):6-13.
28. Santos-Oliveira JR¹, Regis EG, Giacoia-Gripp CB, Valverde JG, Alexandrino-de-Oliveira P, Lindoso JÂ, Goto H, Oliveira-Neto MP, Guerra JO, Grinsztejn B, Jerônimo SB, Morgado MG, Da-Cruz AM. Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection. *J Infect Dis.* 2013 Jul;208(1):57-66.
29. Medrano FJ¹, Rey C, Leal M, Cañavate C, Rubio A, Sánchez-Quijano A, Alvar J, Lissen E. Dynamics of serum cytokines in patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection. *Clin Exp Immunol.* 1998 Dec;114(3):403-7.

30. Casado JL¹, Abad-Fernández M, Moreno S, Pérez-Elías MJ, Moreno A, Bernardino JI, Vallejo A. Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-1-coinfected patients. *HIV Med.* 2015 Apr;16(4):240-8.
31. Chou JP¹, Ramirez CM, Wu JE, Effros RB. Accelerated aging in HIV/AIDS: novel biomarkers of senescent human CD8⁺ T cells. *PLoS One.* 2013 May 22;8(5):e64702.
32. Kaushal H, Bras-Gonçalves R, Negi NS, Lemesre JL, Papierok G, Salotra P¹. Role of CD8(+) T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals. *BMC Infect Dis.* 2014 Dec 3;14:653.
33. Serrano-Villar S¹, Pérez-Elías MJ¹, Dronda F¹, Casado JL¹, Moreno A¹, Royuela A², Pérez-Molina JA¹, Sainz T³, Navas E¹, Hermida JM¹, Quereda C¹, Moreno S¹. Increased risk of serious non-AIDS-related events in HIV-infected subjects on antiretroviral therapy associated with a low CD4/CD8 ratio. *PLoS One.* 2014 Jan 30;9(1):e85798.
34. Appay V¹, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol.* 2008 Jan;214(2):231-41.
35. Deeks SG¹, Verdin E, McCune JM. Immunosenescence and HIV. *Curr Opin Immunol.* 2012 Aug;24(4):501-6.
36. Wortmann G, Sweeney C, Houg HS, Aronson N, Stiteler J, Jackson J, et al. Rapid diagnosis of Leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2001 Nov;65(5):583-7.
37. Gomes LI, Gonzaga FM, de Moraes-Teixeira E, de Souza-Lima BS, Freire VV, Rabello A. Validation of quantitative real-time PCR for the in vitro assessment of anti Leishmanial drug activity. *Experimental parasitology.* 2012 Jun;131(2):175-9.
38. Musso O, Sommer P, Drouet E, Cotte L, Neyra M, Grimaud JA, et al. In situ detection of human cytomegalovirus DNA in gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR-derived methods. *Journal of virological methods.* 1996 Feb;56(2):125-37.
39. Dos Santos Marques LH, Gomes LI, da Rocha IC, da Silva TA, Oliveira E, Moraes MH, et al. Low parasite load estimated by qPCR in a cohort of children living in urban area endemic for visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases.* 2012 6(12):e1955.
40. Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine.* 1999 Apr;11(4):305-12.
41. Fagundes-Silva G a, Vieira-Goncalves R, Nepomuceno MP, de Souza M a, Favoreto S, Oliveira-Neto MP, et al. Decrease in anti-Leishmania IgG3

and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol* [Internet]. 2012;34(10):486–91.

Table 1: Clinical evolution and demographic characteristics of the coinfecting patients with visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV).

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

WMC (HLV017)	38 years, male	14	Yes	14	NA	No	Amphotericin B deoxycholate for 20 days	Irregular use of prophylaxis (amphotericin B deoxycholate biweekly), use for 18 months (until CD4 recovery)	12 months	VL relapse at 4, 6 and 12 month follow-up
PRP (HLV019)	45 years, male	69	Yes	69	NA	No	Amphotericin B deoxycholate for 20 days	Irregular use of prophylaxis (amphotericin B deoxycholate biweekly), use for 13 months (until CD4 recovery)	12 months	VL relapse at 8 month follow-up
JTS (HLV021)	45 years, male	139	Yes	113	25	Yes (4)	Liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Irregular use of prophylaxis (amphotericin B deoxycholate biweekly)	12 months	VL relapse at 2, 8 and 12 month follow-up
VPGS (HLV022)	21 years, male	25	No	1	24	Yes (1)	Liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Amphotericin B deoxycholate biweekly for 13 months (until CD4 recovery)	12 months	VL relapse at 6 month follow-up
AMP (HLV023)	39 years, male	239	Yes	117	121	Yes (7)	Liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Liposomal amphotericin weekly on regular basis	12 months	VL relapse at 6 and 12 month follow-up
AMGN (HLV024)	37 years, female	155	Yes	107	47	Yes (1)	Amphotericin B deoxycholate for 20 days	Irregular use of amphotericin B deoxycholate biweekly for 4 months	4 months (lost of follow-up)	No VL relapse during short follow-up
DCLS (HLV025)	30 years, male	2	No	2	NA	No	Amphotericin B deoxycholate for 25 days	Amphotericin B deoxycholate biweekly for 13 months (until CD4 recovery)	12 months	No VL relapse
ACL (HLV026)	52 years, male	128	No	0	128	Yes (2)	Liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Amphotericin B deoxycholate biweekly for 8 months (until CD4 recovery)	12 months	No VL relapse

Table Supplementary 1: Copies per mL numbers of viral RNA and kDNA of *Leishmania (L.) infantum* presented by coinfecting patients with visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV).

		Active Phase		Post-treatment		6mpt		12 mpt	
		Viral load (RNA copies/mL)	Parasite load (kDNA copies/mL)	Viral load (RNA copies/mL)	Parasite load (kDNA copies/mL)	Viral load (RNA copies/mL)	Parasite load (kDNA copies/mL)	Viral load (RNA copies/mL)	Parasite load (kDNA copies/mL)
HLV01	NON RELAPSE	20272	38171	571	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	1.3
HLV06		55	206162	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.
HLV07		Undet.	159550	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.
HLV013		153316	Undet.	1118	Undet.	Undet.	Undet.	60 (10 mpt)	Undet.
HLV016		Undet.	78	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.
HLV025		51	506308	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	1061258	Undet.
HLV03	RELAPSE	Undet.	46989	Undet.	Undet.	Abandoned follow-up			
HLV05		1146	37271	181	Undet.	394230	Undet.	157833	Undet.
HLV09		Undet.	41.1	Undet.	12718	Undet.	0.8	Undet.	1334
HLV010		Undet.	3147	--	1467	Undet.	Undet.	--	Undet.
HLV012		405	0.2	194	3024000	23004	5400	Death	
HLV017		Undet.	115454	Undet.	430	Undet.	2663	Undet.	--
HLV019		Undet.	40177	Undet.	Undet.	Undet.	Undet.	--	23.5
HLV021		56543	813	4897	622	86899	3262	178326	Undet.
HLV022		Undet.	38281	60	220	--	7909	82	54
HLV023		47	25118	Undet.	6369	339	2030	--	1.1
HLV024		135957	81656	68075	Undet.	--	24705	190839	4442
HLV026		250310	15701	7311	116	133219	Undet.	--	Undet.

Figure legends:

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

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

Figure 3: Relationship between plasma factors related to microbial translocation and the immune status of coinfecting patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 (VL/HIV). Plasma sCD14 levels assessment in relapsing (R) and non-relapsing (NR) group during all the follow up visits (A). A negative correlation between sCD14 levels and absolute counts of CD4⁺ T lymphocytes (B) in co-infected patients (Spearman correlation, p<0.0005; r = -0.5). A positive correlation between sCD14 levels and LPS levels (C) in co-infected patients (Spearman correlation, p<0.001; r = 0.4). The red dashed line represents the median value of sCD14 levels (median: 699 ng/mL; IQR: 155 – 1525 ng/mL). Each symbol represents one patient and the color refers to the same patient at different stages of follow up. The horizontal bars represent the median values. 6 months post-treatment (6 mpt); 12 months post-treatment (12 mpt). Asterisks denote statistically significant difference between NR and R group, *p<0.05.

Figura 4: Titres of anti-*Leishmania (L.) infantum* immunoglobulin G3 (IgG3) isotype in coinfecting patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 (VL/HIV). IgG3 levels in relapsing (R) and non-relapsing (NR) group during all

the follow up. The Red dashed line represents the median value of IgG3 levels in healthy controls (median: 0.18; IQR: 0.1 – 0.3). Each symbol represents one patient and the color refers to the same patient at different stages of follow up. The horizontal bars represent the median values. 6 months post-treatment (6 mpt); 12 months post-treatment (12 mpt). Asterisks denote statistically significant difference between NR and R group, *p<0.05.

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

Supplementary Figures legends:

Figure supplementary 1: Titres of anti-*Leishmania (L.) infantum* immunoglobulin G (IgG) and G1 (IgG1) isotype in coinfectad patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 (VL/HIV). IgG and IgG1 levels in relapsing (R) and non-relapsing (NR) group during all the follow up. The Red dashed line represents the median value of IgG and IgG1 levels in healthy controls (median: 0.85 and 0.19; IQR: 0.5 – 1.1 and 0.08 – 0.55, respectively). Each symbol represents one patient and the color refers to the same patient at different stages of follow up. The horizontal bars represent the median values. 6 months post-treatment (6 mpt); 12 months post-treatment (12 mpt).

Figure 2: Immune reconstitution of coinfecting patients with visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV).

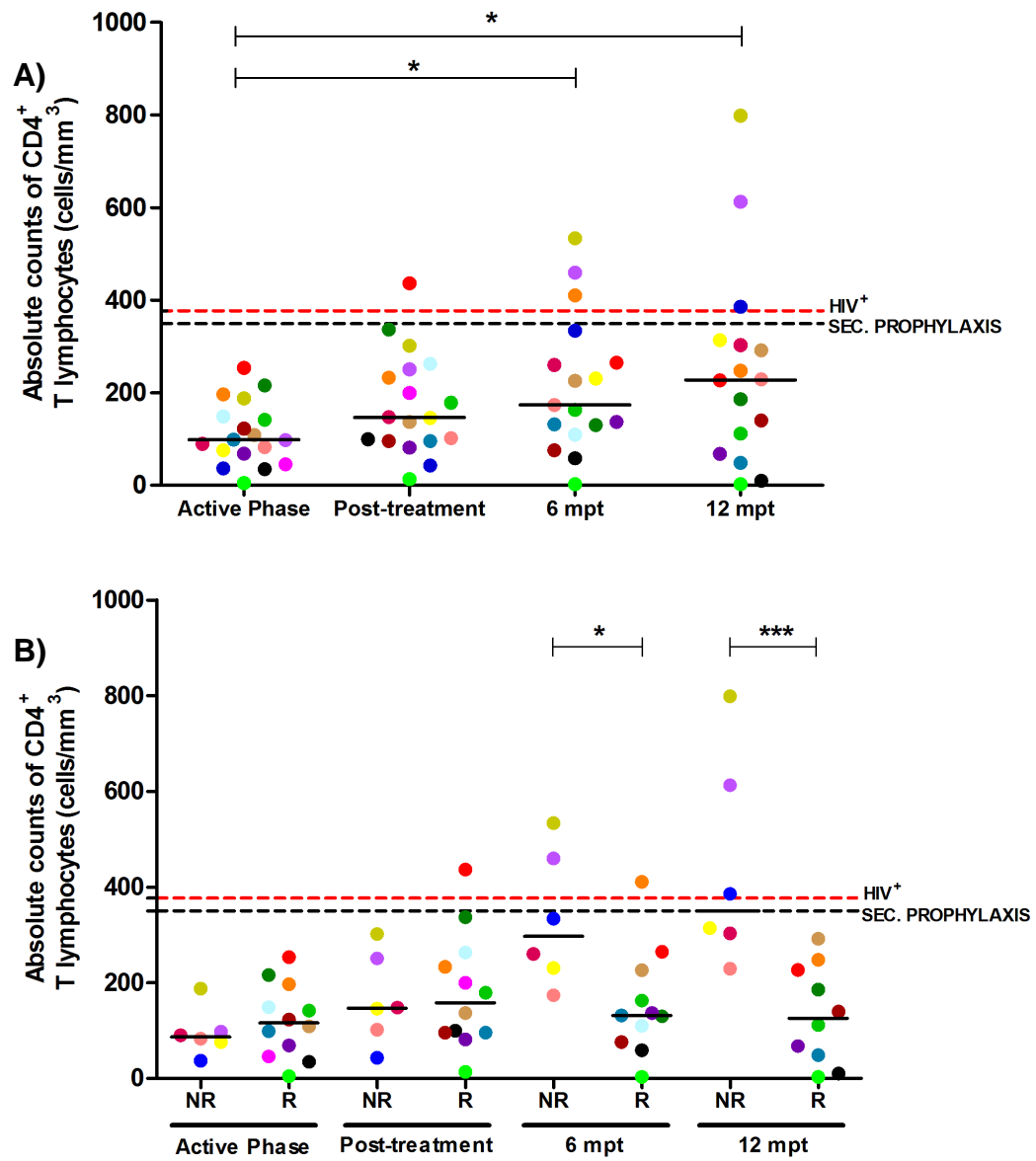


Figure 2: Activation levels of the subpopulations of T lymphocytes in coinfecting patients with visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV).

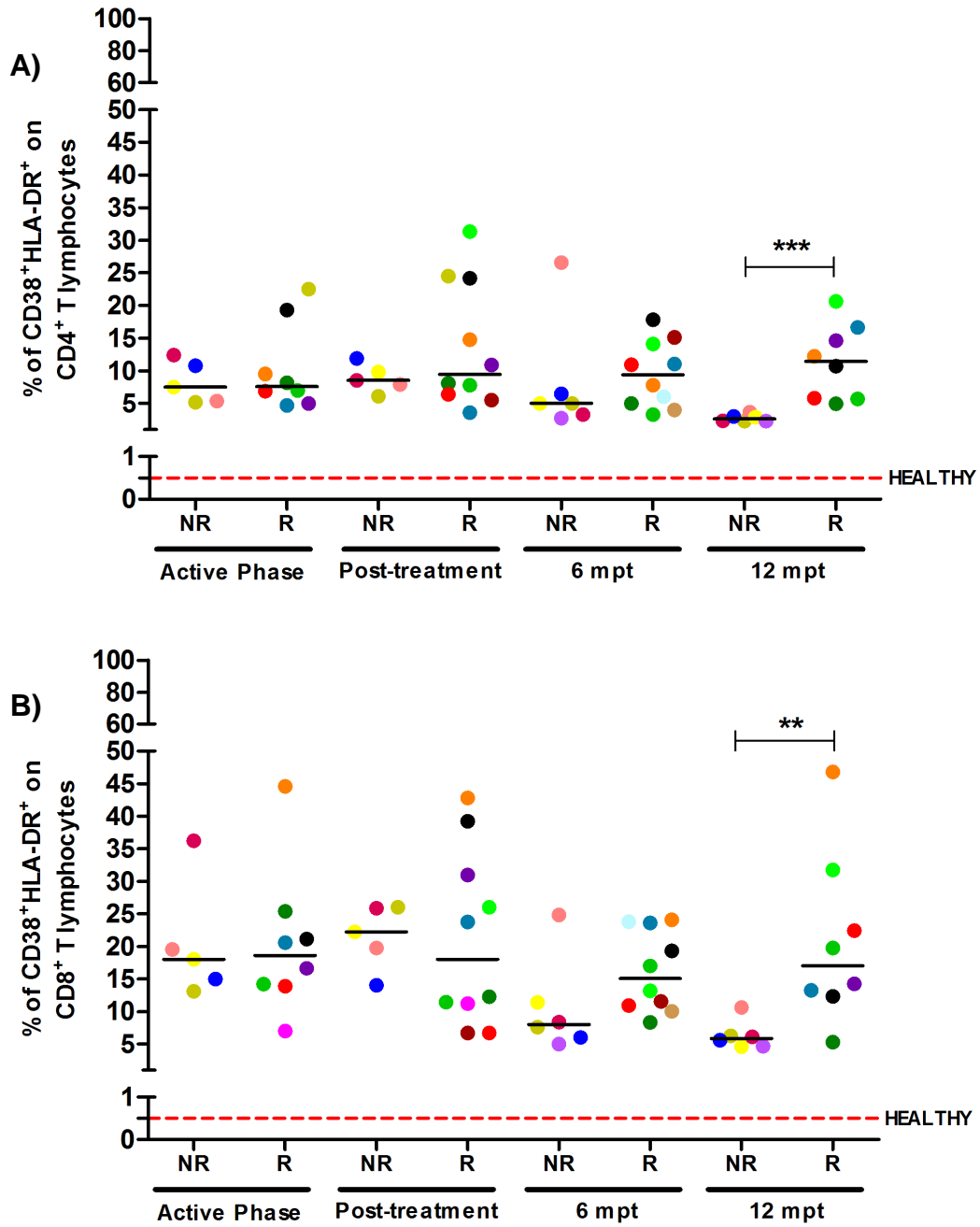


Figure 3: Relationship between plasma factors related to microbial translocation and the immune status of co-infected patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 (VL/HIV).

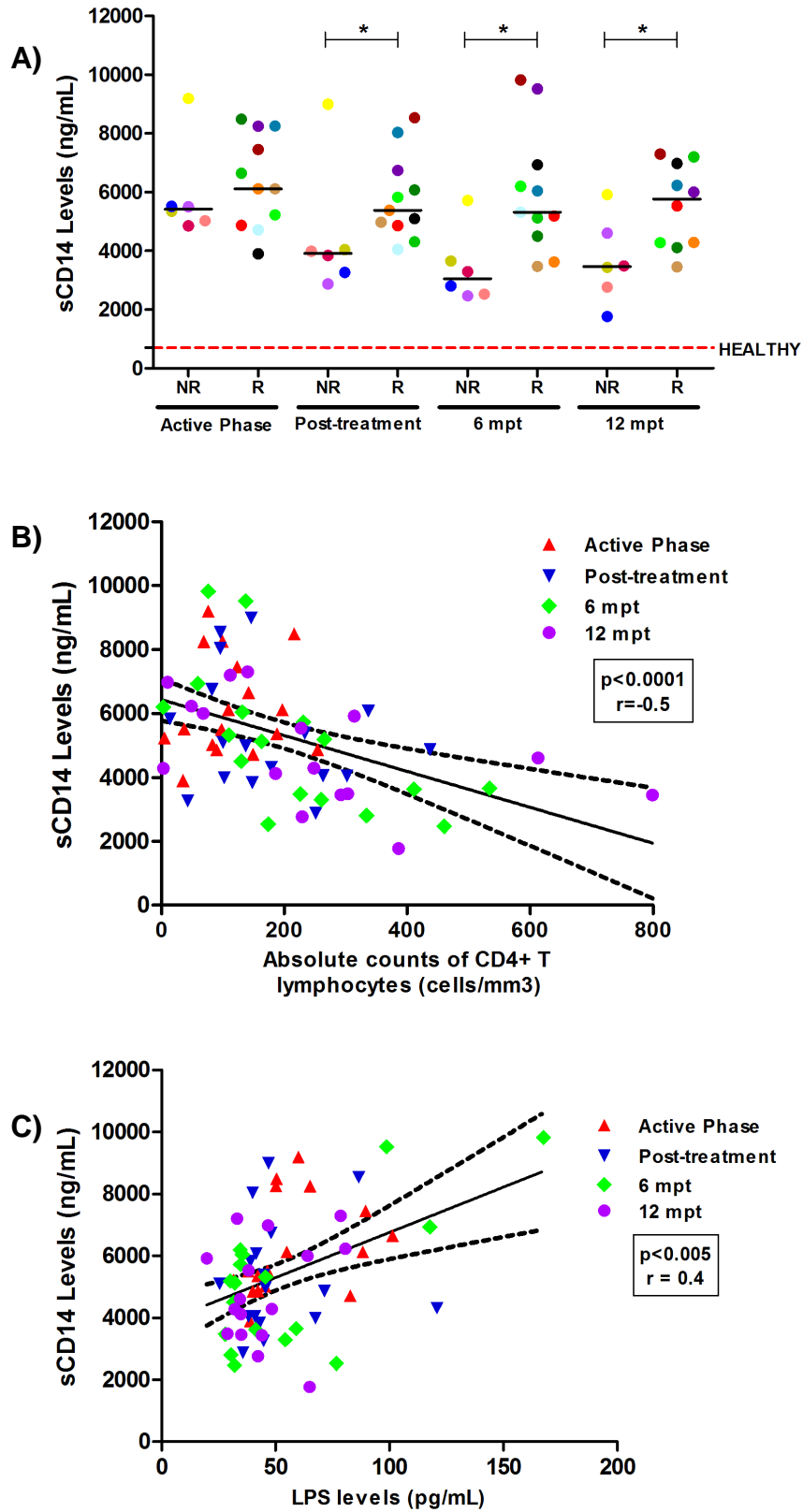


Figura 4: Titres of anti-*Leishmania (L.) infantum* immunoglobulin G3 (IgG3) isotype in co-infected patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 (VL/HIV).

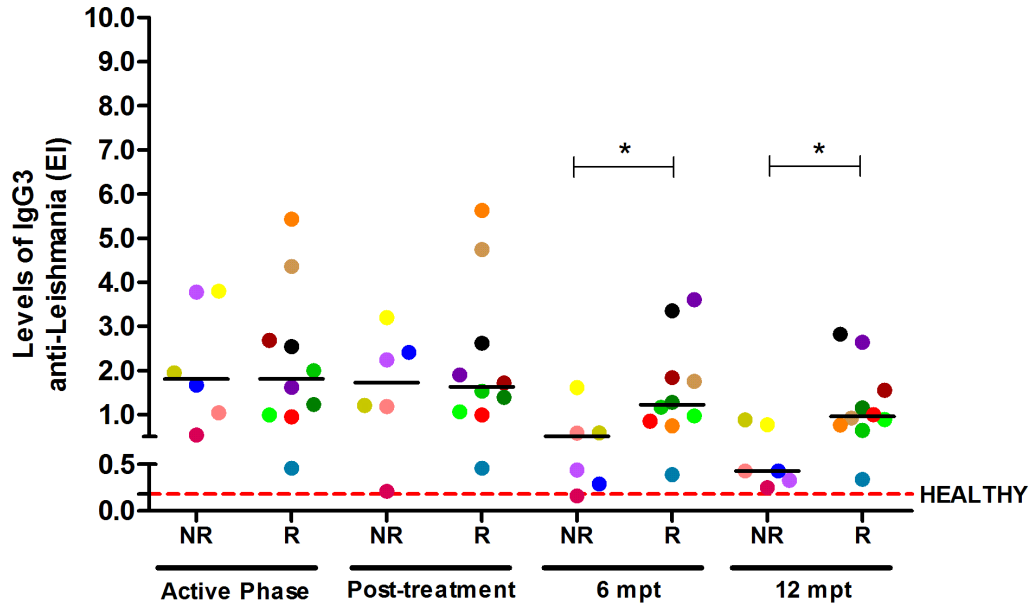
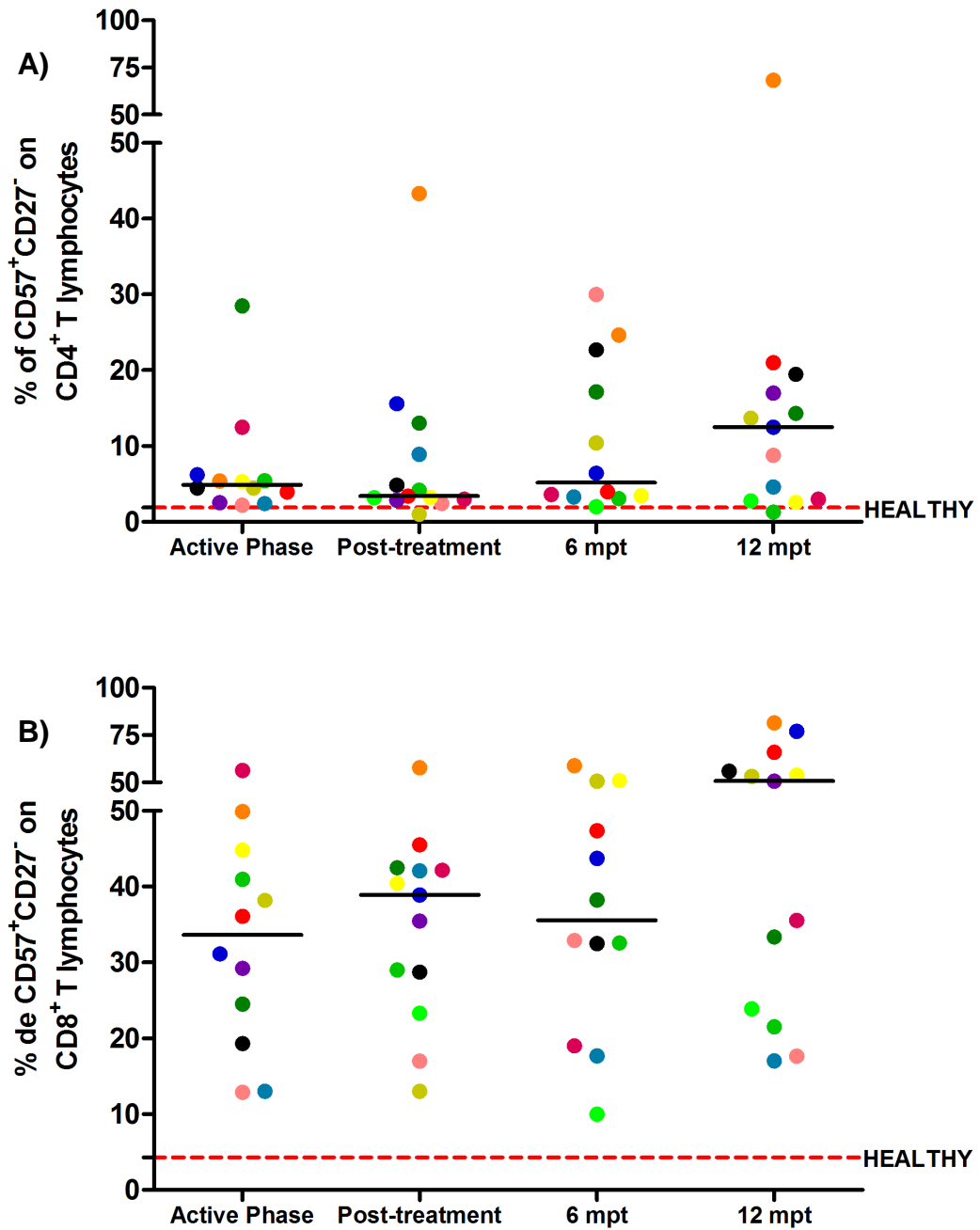


Figura 5: Immunosenescence levels in coinfecting patients with visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV).



Supplementary figures

Supplementary Figure 1: Titres of anti-*Leishmania (L.) infantum* immunoglobulin G (IgG) and G1 (IgG1) isotype in coinfecting patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 (VL/HIV).

