

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA E ALTERAÇÕES  
IMUNOPATOGÊNICAS DA LEISMANIOSE VISCERAL COMO  
COFATORES DA ATIVAÇÃO CELULAR, IMUNOSENESCÊNCIA E  
DISTÚRBIOS NO REPERTÓRIO  $V\beta$  EM PACIENTES DE  
COINFECÇÃO *LEISHMANIA*/HIV-1**

**JOANNA REIS SANTOS DE OLIVEIRA**

Rio de Janeiro

2012

**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Instituto Oswaldo Cruz**  
**Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**JOANNA REIS SANTOS DE OLIVEIRA**

**TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA E ALTERAÇÕES  
IMUNOPATOGÊNICAS DA LEISMANIOSE VISCERAL COMO  
COFATORES DA ATIVAÇÃO CELULAR, IMUNOSENESCÊNCIA E  
DISTÚRBIOS NO REPERTÓRIO V $\beta$  EM PACIENTES DE  
COINFECÇÃO *LEISHMANIA*/HIV-1**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical, área de concentração: Imunologia

Orientadora: Alda Maria Da-Cruz

Coorientadora: Carmem Giacoia-Gripp

Rio de Janeiro

2012

ii

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

O482 Oliveira, Joanna Reis Santos de

Translocação microbiana e alterações imunopatogênicas da leishmaniose visceral como cofatores da ativação celular imunosenescência e distúrbios no repertório  $v\beta$  em pacientes de coinfeção *Leishmania*/HIV-1/Joanna Reis Santos de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2012.

xix, 243 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2012.

Bibliografia: f. 166-191

1. Leishmaniose visceral . 2. HIV/AIDS. 3. Coinfeção *Leishmania*-HIV. 4. Ativação celular. 5. Resposta inflamatória. I. Título.

CDD 616.936 4

**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Instituto Oswaldo Cruz**  
**Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA E ALTERAÇÕES  
IMUNOPATOGÊNICAS DA LEISMANIOSE VISCERAL COMO  
COFATORES DA ATIVAÇÃO CELULAR, IMUNOSENESCÊNCIA E  
DISTÚRBIOS NO REPERTÓRIO V $\beta$  EM PACIENTES DE  
COINFECÇÃO *LEISHMANIA*/HIV-1**

Autor: Joanna Reis Santos de Oliveira

Orientadores: Profa. Dra. Alda Maria Da-Cruz

Dra. Carmem Giacoia-Gripp

**EXAMINADORES:**

---

PROFA. DRA. MARIZA GONÇALVES MORGADO (PRESIDENTE DA BANCA/IOC-FIOCRUZ)

---

PROF. DR. ÁLVARO L. BERTHO (IOC/FIOCRUZ) – (IOC/FIOCRUZ)

---

PROFA. DRA. ADRIANA BONOMO (REVISORA/SUPLENTE – UFRJ/IOC-FIOCRUZ)

---

PROFA. DRA. AMÉLIA M. RIBEIRO DE JESUS (CCBS/UFS)

---

PROF. DR. CARLOS HENRIQUE NERY COSTA (INSTITUTO NATAN PORTELLA/UFPI-PIAUÍ)

---

PROFA. DRA. FERNANDA GRASSI (CPQGM/FIOCRUZ-BA)

---

PROF. DR. GONZALO BELLO (IOC/FIOCRUZ) - SUPLENTE

Rio de Janeiro, 2012



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de trilhar meu caminho ao lado de uma família e de amigos que me amam tanto.

Gostaria de agradecer imensamente aos meus pais (Jacira e Geraldo) e à minha madrinha (Suely) pelas incessantes demonstrações de carinho, amor e compreensão ao longo de todos esses anos e especialmente nos momentos difíceis e de maior estresse, quando precisei ficar longe de deles. Minha eterna gratidão pela incansável paciência, dedicação e ensinamentos recebidos. Agradeço a toda a minha família pelo carinho e incentivo, mais especialmente, ao meu tio “Zeca”, tia Jara, e às minhas primas, Denise e Mônica. Meus sinceros agradecimentos cheios de saudade ao meu tio Dennis por toda torcida desde a época do colégio “Martinsinho”. Amo todos vocês!

Ao meu querido namorado Eduardo Regis pelo companheirismo de todos esses anos e por tornar minha vida mais feliz a cada dia. Obrigada pelos seus “santos ouvidos”, paciência, carinho e conforto durante o período em que estive viajando e nos momentos finais de preparação desta tese. Além, é claro, das nossas discussões científicas “fora de hora”, ajuda na execução e publicação dos trabalhos.

A minha querida orientadora Dra. Alda Maria Da-Cruz pela oportunidade e confiança depositadas em mim desde o mestrado para trabalhar em um projeto tão apaixonante e desafiador. Agradeço pelos conselhos dados e por todos os momentos de discussões científicas, os quais me ajudaram a amadurecer, a desenvolver um pensamento crítico e cada vez mais admirar seu trabalho e seu grupo. Obrigada pela incrível amizade e companhia de todos esses anos!

A minha adorável co-orientadora Dra. Carmem Giacoia-Gripp pela atenciosa orientação, preocupação e pelos ensinamentos recebidos para o trabalho adequado dentro do Laboratório de Aids e Imunologia Molecular. Agradeço pelo convite feito há alguns atrás, durante a monitoria da faculdade, para vir tentar a Pós-Graduação na Fiocruz. Sua simpatia, ternura e disponibilidade foram essenciais para o desenvolvimento das etapas desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a todos do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, especialmente aos amigos Adriano Gomes-Silva, Carolina de Oliveira Mendes-Aguiar e Ricardo dos Santos Nogueira, que me receberam anos atrás e pacientemente me ensinaram e ajudaram a trilhar o caminho que hoje sigo de modo mais

independente. Aos amigos, Giselle Fagundes Silva, Raquel Ribeiro-Romão, Milene Kitahara, Daniele Barbi, Ricardo Gonçalves e Eduardo Pinto por nossa alegre convivência diária. Agradeço a todos pelos conselhos, ensinamentos, discussões científicas, idas a congressos, churrascos, sábados de trabalho, “caronas”, alegrias e tristezas. Agradeço às queridas amigas, já não mais presentes no grupo, mas presentes em nossos corações, Claudia Covas, Regina Pereira de Carvalho e, em especial a Joanna Valverde pela hospedagem e linda amizade durante as viagens a Natal para a execução de uma etapa do presente trabalho. Obrigada pela colaboração nas técnicas de biologia molecular.

Aos queridos amigos, Luzinei Couto e Elaine Paulo pela incansável ajuda e contribuição na execução deste trabalho, especialmente nos momentos em que estava viajando e pude ficar tranquila quanto à continuação dos experimentos e chegada de material dos pacientes em acompanhamento. Obrigada pelo carinho, amizade e por compartilharem comigo o “desespero” pela entrega do material dos pacientes.

Ao Dr. Daniel Douek do National Institute of Health (NIH) pela calorosa recepção em seu laboratório durante o doutorado, pela paciência em me entender nas nossas discussões e pela incrível oportunidade de trabalhar ao lado da Dra. Netanya Sandler num projeto de translocação microbiana em macacos rhesus infectados por SIV. Agradeço também a “lab manager” Dra. Brenna Hill pelos ensinamentos recebidos a respeito da técnica da quantificação dos TRECS.

À querida Rosângela Leite Pelegrino e Flávia Marvila pela ajuda na resolução das pendências que surgiam ao longo do dia e na papelada necessária para o envio e retorno das caixas de material biológico com as amostras dos pacientes. Agradeço à bióloga Rosa Plácido, pela ajuda com as culturas de *Leishmania sp*, congelamentos e descongelamentos de *vials* e por se esforçar diariamente pra deixar nosso laboratório em ordem.

Agradeço à Dra. Mariza Morgado, chefe do laboratório de Aids e Imunologia Molecular pela importante e indispensável colaboração nesse trabalho, bem como todos os seus ensinamentos e sugestões desde o início do projeto. Obrigada por disponibilizar seu laboratório como ambiente de trabalho e para importantes discussões com o seu grupo. Agradeço à maravilhosa equipe deste laboratório, que por ser muito grande não me atrevo a descrever todos os nomes, mas saibam que sou muito feliz e grata pela prazerosa colaboração e amizade. Um agradecimento especial às amigas, Fernanda Heloíse Cortes, Tatiana Silva, Geane Flores, Priscila Guimarães e Gisele Borges.

Ao Dr. Álvaro Bertho e às amigas Raquel Ferraz e Clarissa Cunha pelos constantes ensinamentos em citometria de fluxo, ajuda na aquisição e análise das amostras e total paciência e disponibilidade para qualquer dúvida no trabalho. Obrigada pela ajuda com a interpretação e melhor maneira de representar o repertório Vβ e por ter aceitado o convite para a banca.

À Dra. Selma Jerônimo do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pela colaboração neste trabalho no que se refere aos seus conhecimentos de biologia molecular e quantificação parasitária. Obrigada pela disponibilidade em me receber em seu laboratório para a execução destes experimentos.

Ao Dr. Sérgio Mendonça, chefe do Laboratório de Imunoparasitologia do IOC e a todos os seus membros pelo profissionalismo e pelo espaço de trabalho onde foram executados os primeiros anos desta tese.

Ao Dr. Filipe Anibal, que além de ser o coordenador da Pós-Graduação em Medicina Tropical, foi quem me ajudou nas análises estatísticas dos manuscritos deste trabalho.

Meus agradecimentos aos médicos e pesquisadores pela colaboração neste projeto, pelo encaminhamento dos pacientes com suas respectivas informações e evolução clínica. Agradeço pela paciência, dedicação e profissionalismo com que sempre me receberam e me ajudaram apesar de todas as nossas dificuldades (caos aéreo, tempestades, greves, operadoras de transporte de material biológico e etc) ao longo desses anos.

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 confiaram na pesquisa e na medicina para continuaram lutando por suas vidas.

Aos membros da banca examinadora que prontamente aceitaram o convite e com certeza serão indispensáveis para o crescimento do trabalho.

Agradeço profundamente às minhas amigas Rafaela Campagnoli e Juliana Santos, do curso de graduação em Ciências Biológicas, por sempre estarem presentes, compartilhando todos os momentos desta nossa difícil caminhada acadêmica.

Ao PN/DST/AIDS 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 doutorado (2008-2010) e à FAPERJ (2010-2012, Faperj nota 10) pelos dois anos finais.

## **PREFÁCIO**

Esta tese está organizada da seguinte forma:

**Capítulo 1:** Introdução, Racional e Objetivos.

**Capítulo 2:** Artigos e apêndice de resultados

Neste capítulo estão anexados os quatro artigos que compõem a tese, substituindo os tópicos de Metodologia e Resultados. Dentre os quatro artigos apresentados, três encontram-se publicados e o último submetido. Além disso, também são mostrados resultados adicionais, ainda não organizados sob a forma de manuscritos.

**Capítulo 3:** Discussão, conclusões e perspectivas.

**Capítulo 4:** Referências bibliográficas

### **Anexos**

Anexo 1: Produção científica como colaborador do artigo científico em que foram avaliadas as características clínicas e epidemiológicas de pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV-HIV-1/AIDS) da região centro-oeste do Brasil.

Anexo 2: Produção científica como colaborador do artigo científico em que foi avaliado o perfil imunológico de pacientes coinfectados HIV-1/*Mycobacterium leprae*, especialmente no que se refere ao *status* de ativação e diferenciação celular. Neste artigo foram identificados seis pacientes em síndrome inflamatória da reconstituição imune (IRIS/RR), os quais mostraram níveis elevados de ativação celular num momento anterior a este episódio.

Anexo 3: Produção científica a qual contém uma revisão sobre o fenômeno da translocação microbiana na leishmaniose visceral em pacientes concomitantemente infectados ou não pelo HIV-1.

Anexo 4: Produção científica como colaborador do artigo científico em que foi avaliado o grau de anemia, densidade parasitária e comprometimento dos sistema imune em pacientes coinfectados *Plasmodium falciparum*/HIV-1.

Anexo 5: Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes e dos voluntários sadios.

Anexo 6: Documento de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos.

<b>ÍNDICE</b>	
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE ARTIGOS, MANUSCRITOS, FIGURAS E ANEXOS</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xviii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos epidemiológicos da coinfeção <i>Leishmania</i> /HIV-1	1
1.2 Leishmaniose visceral: aspectos imunopatogênicos	3
1.3 História natural e imunopatogenia da infecção pelo HIV-1	5
<b>2. Ativação do sistema imune e doenças inflamatórias e infecciosas</b>	<b>8</b>
2.1 Infecção pelo HIV-1 – modelo de ativação crônica do sistema imune	11
2.2 Sistema imune de mucosa e ativação celular na infecção pelo HIV-1	13
2.3 Coinfecções – cofatores da ativação celular	16
2.4 Ativação celular e resposta pró-inflamatória na leishmaniose visceral - implicações na imunopatogenia da coinfeção <i>Leishmania</i> /HIV-1	18
2.5 Exaustão do sistema imune como consequência da ativação celular – implicações para os pacientes de coinfeção <i>Leishmania</i> /HIV-1	22
2.5.1 Imunosenescência	22
2.5.2 Prejuízo das funções tímicas e da diversidade de linfócitos T	25
2.5.3 Repertório de células T $\alpha\beta$	28
<b>3. RACIONAL</b>	<b>33</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
4.1 Geral	35

4.2 Específicos	35
<b>5. MÉTODOS E RESULTADOS</b>	37
5.1 Artigo 1	38
5.2 Artigo 2	44
5.3 Artigo 3	50
5.4 Manuscrito 1 (submetido)	62
5.5 Apêndice de Resultados	93
5.6 Casuística	93
5.7 Metodologia	95
5.8 Resultados	102
<b>6. DISCUSSÃO</b>	135
<b>7. CONCLUSÕES</b>	163
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	165
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	166
<b>ANEXOS</b>	192

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Do inglês, Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
Ag-Li	Antígeno de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>
Ag-p24	Antígeno da proteína de 24 quilodáltons do nucleocapsídeo do HIV-1
AIDS	Do inglês, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AZT	Azidotimidina ou zidovudina
BCR	Do inglês, Receptor de células B
CCR5	Do inglês, Receptor de células humanas para quimiocina da família CC
CD	Do inglês, <i>Cluster of differentiation</i>
CDR3	Do inglês, região determinante de complementariedade
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
CMV	Citomegalovírus
Con-A	Concanavalina A
CXCR4	Do inglês, Receptor de células humanas para quimiocina da família CXC
DNA	Do inglês, Ácido desoxirribonucléico
DTH	Do inglês, reação de hipersensibilidade tardia
EBV	Do inglês, Vírus Epstein-Barr
ELISA	Do inglês, <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ETC	Emigrante tímico recente
FITC	Do inglês, Isotiocianato de fluoresceína
GALT	Do inglês, Tecido linfoide associado à mucosa
GBV-C	Do inglês, Vírus da hepatite G
GP	Do inglês, Glicoproteína do envelope do HIV-1
HBV	Do inglês, Vírus da hepatite B
HCV	Do inglês, Vírus da Hepatite C
HDL	Do inglês, lipoproteína de alta densidade

HIV-1	Do inglês, Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HLA-DR	Do inglês, Antígeno leucocitário humano do tipo II
HTLV-1	Do inglês, Vírus linfotrópico T humano do tipo 1
IBD	Do inglês, <i>Inflammatory bowel disease</i>
IFABP	Do inglês, <i>Intestinal fatty acid binding protein</i>
IFN- $\gamma$	Do inglês, Interferon gama
Igs	Do inglês, Imunoglobulinas
IL	Do inglês, Interleucina
IRIS	Do inglês, Síndrome inflamatória da reconstituição imune
LACK	Do inglês, <i>Leishmania homologue of receptor for activated C kinase</i>
LBP	Do inglês, Proteína ligadora de LPS
LC	Leishmaniose Cutânea
LPG	Do inglês, Lipofosfoglicano
LPS	Do inglês, Lipopolissacarideo
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose Visceral
MAG-1	Do inglês,
MHC	Do inglês, Complexo principal de histocompatibilidade
NF-kB	Do inglês, Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Do inglês, <i>Natural killer</i>
NKT	Do inglês, <i>Natural killer T</i>
NRTI	Do inglês, Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor
NNRTI	Do inglês, Non- Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor
MIF	Do inglês, fator de inibição da migração de macrófagos
MIP-1 $\alpha$	Do inglês, Proteína inflamatória de macrófago alfa
MIP-1 $\beta$	Do inglês, Proteína inflamatória de macrófago beta



PAMPS	Do inglês, Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Do inglês, Reação em cadeia da polimerase
PD-1	Do inglês, Programmed cell death 1
PD-L1	Do inglês, Programmed cell death 1ligand
PE	Do inglês, Ficoeritrina
PercP	Do inglês, Peridina-clorofila
PIs	Do inglês, Protease inhibitors
PRR	Do ingles, pattern recognition receptors
RANTES	Do inglês, Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted
RNA	Do inglês, Ácido ribonucleico
RPL	Resposta proliferativa de linfócitos
SINAN	Sistema de Informações de Agravos de Notificações
SIV	Do inglês, Vírus da imunodeficiência símia
TARV	Terapia antiretroviral altamente potente
TB	Tuberculose
TCR	Do inglês, Receptor de células T
TGF- $\beta$	Do inglês, Fator de crescimento tumoral beta
Th17	Do inglês, Linfócito T auxiliar produtor de interleucina 17
TLRs	Do inglês, Receptores do tipo Toll
T <sub>MC</sub>	Linfócito T de memória central
T <sub>ME</sub>	Linfócito T de memória efetora
TNF	Do inglês, Fator de Necrose Tumoral
TREC	Do inglês, <i>TCR rearrangement excision circles</i>
TSST-1	Do inglês, toxina-1 da síndrome do choque tóxico
V $\beta$	Região variável da cadeia beta do TCR

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Descrição dos 24 anticorpos disponíveis no kit IOTest Beta Mark utilizados para a análise do repertório V $\beta$ e suas especificidades antigênicas.....	100
<b>Tabela 2.</b> Avaliação prospectiva dos pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1) e seus respectivos momentos clínicos de acompanhamento.....	103
<b>Tabela 3.</b> Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1(LV/HIV-1).....	106
<b>Tabela 4.</b> Famílias V $\beta$ utilizadas pelo repertório T dos pacientes coinfectados de LV/HIV-1 em comum aos diferentes grupos e suas diferenças estatísticas.....	123
<b>Tabela 5.</b> Percentuais de utilização de algumas famílias V $\beta$ nas subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> frente aos antígenos de <i>Leishmania infantum</i> e p24 do HIV-1 no paciente LV/HIV-1 (Pt1) acompanhado na fase ativa da LV e no pós-tratamento anti- <i>Leishmania</i> .....	133
<b>Tabela 6.</b> Percentuais de utilização de algumas famílias V $\beta$ nas subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> frente aos antígenos de <i>Leishmania infantum</i> e p24 do HIV-1 no paciente LV/HIV-1 (Pt3) acompanhado na fase ativa da LV e no pós-tratamento anti- <i>Leishmania</i> .....	134
<b>Tabela 7.</b> Percentuais de utilização de algumas famílias V $\beta$ nas subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> frente aos antígenos de <i>Leishmania infantum</i> e p24 do HIV-1 no paciente LV/HIV-1 (Pt12) acompanhado na fase ativa da LV e no pós-tratamento anti- <i>Leishmania</i> .....	134

## LISTA DE ARTIGOS, MANUSCRITOS, FIGURAS E ANEXOS

<b>Artigo 1.</b> “High levels of T lymphocyte activation in <i>Leishmania</i> -HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load”.....	37
<b>Artigo 2.</b> “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 <i>Leishmania</i> ” species.....	44
<b>Artigo 3.</b> “Evidence that lipopolisaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis”.....	50
<b>Manuscrito 1.</b> “Intense inflammatory response in treated visceral leishmaniasis patients co-infected with HIV-1 may also be due to microbial translocation”.....	62
<b>Esquema 1.</b> Etapas do protocolo de análise citofluorimétrica para as moléculas associadas à senescência replicativa (CD57 e CD27). R1-população de linfócitos definida por tamanho e granularidade e R2 e R3- população de linfócitos T expressando as moléculas CD4 e CD8, respectivamente.....	99
<b>Esquema 2.</b> Etapas do protocolo de análise citofluorimétrica para a determinação do percentual de células T expressando determinada cadeia Vβ. R1-população de linfócitos definida por tamanho e granularidade e R2 e R3- população de linfócitos T expressando as moléculas CD4 e CD8, respectivamente.....	101
<b>Figura 1.</b> Avaliação dos parâmetros laboratoriais e virais dos pacientes coinfetados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1).....	109
<b>Figura 2.</b> Avaliação do grau de senescência replicativa nos pacientes coinfetados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1).....	112
<b>Figura 3.</b> Avaliação do grau de senescência replicativa em cinco pacientes coinfetados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1) de acompanhamento longitudinal.....	113
<b>Figura 4.</b> Avaliação do grau de senescência replicativa <i>in vitro</i> frente aos estímulos de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> (Li) e HIV-1 (p24) em três pacientes coinfetados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1) avaliados na fase ativa da LV e logo após o tratamento anti- <i>Leishmania</i> .....	114
<b>Figura 5.</b> Percentuais medianos de utilização das 24 famílias Vβ nas subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> nos indivíduos sadios (A), nos pacientes infectados pelo HIV-1, sem leishmaniose visceral (B) e nos pacientes de leishmaniose visceral (LV) negativos para HIV-1, na fase ativa e no pós-tratamento anti- <i>Leishmania</i> (C e D). .....	118
<b>Figura 6.</b> Percentuais medianos de utilização das 24 famílias Vβ nas subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> (A) e T CD8 <sup>+</sup> (B), nos pacientes	

coinfectedados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1) na fase ativa e no pós-tratamento.....	120
<b>Figura 7.</b> Comparação entre os percentuais medianos de utilização das famílias V $\beta$ nas subpopulação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> nos pacientes LV/HIV-1 na fase ativa e no pós-tratamento com os respectivos grupos de pacientes HIV-1, sem leishmaniose, de LV sem HIV-1 e de indivíduos sadios.....	121
<b>Figura 8.</b> Comparação entre os percentuais medianos de utilização das famílias V $\beta$ nas subpopulação de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> nos pacientes LV/HIV-1 na fase ativa e no pós-tratamento com os respectivos grupos de pacientes HIV-1, sem leishmaniose, de LV sem HIV-1 e de indivíduos sadios.....	122
<b>Figura 9.</b> Distribuição do perfil individual de utilização das 24 famílias V $\beta$ nas subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> nos pacientes LV/HIV-1acompanhados na fase ativa da LV, no pós-tratamento e na remissa clínica.....	126
<b>Figura 10.</b> Distribuição do perfil individual de utilização das 24 famílias V $\beta$ nas subpopulações de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> nos pacientes LV/HIV-1acompanhados na fase ativa da LV, no pós-tratamento e na remissa clínica.....	127
<b>Figura 11.</b> Distribuição do perfil individual de utilização das 24 famílias V $\beta$ nas subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> nos pacientes LV/HIV-1acompanhados na fase ativa da LV, no pós-tratamento e na recidiva.....	129
<b>Anexo 1.</b> Artigo publicado “HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil” .....	193
<b>Anexo 2.</b> Artigo publicado “Evaluation of cellular phenotypes implicated in immunopathogenesis and monitoring immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV/leprosy cases” .....	200
<b>Anexo 3.</b> Artigo publicado “Lipopolysaccharide-induced cellular activation may participate in the immunopathogenesis of visceral leishmaniasis alone or in HIV co-infection”.....	209
<b>Anexo 4.</b> Artigo aceito para a publicação “Enhanced T cell activation is observed in <i>Plasmodium falciparum</i> malaria infected HIV-1 patients from Mozambique” .....	214
<b>Anexo 5.</b> Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes e dos voluntários sadios.....	238
<b>Anexo 6.</b> Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos.....	242

## RESUMO

A coinfeção *Leishmania*/HIV vem sendo considerada uma associação em várias regiões do mundo e a evolução da doença é agravada pelo comprometimento imune causado por ambos os patógenos. A ativação crônica é um dos principais substratos imunopatogênicos decorrentes da infecção pelo HIV-1 e também pela *Leishmania infantum*. Neste contexto, este estudo teve por objetivo avaliar a influência da infecção por *Leishmania* no grau de comprometimento quantitativo e qualitativo dos linfócitos T e na ativação do sistema imune de pacientes coinfectados. Além disso, foram avaliados fatores microbianos associados à ativação celular na leishmaniose visceral (LV) e na coinfeção LV/HIV-1, bem como, o impacto da reconstituição imune pós-terapia antiretroviral (TARV) e do tratamento anti-*Leishmania* na recuperação da resposta imune celular na LV. Para isso, foram avaliados LV/HIV-1, sendo vinte e um casos com LV ativa e quatorze em fase de remissão pós-tratamento anti-leishmania. Sete casos fazem parte de um estudo longitudinal e ainda se encontram em acompanhamento até o momento. Indivíduos com LV (fase ativa e de remissão), casos de HIV-1 e indivíduos sadios também foram estudados como controles. O comprometimento imune foi avaliado através das contagens absolutas de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, expressão de moléculas associadas à ativação celular (CD38) e à senescência/diferenciação replicativa (CD57 e CD27), bem como, pela caracterização das regiões variáveis da cadeia beta (V $\beta$ ) do receptor de linfócitos T *ex vivo* e *in vitro*. Os fatores potencialmente associados à ativação celular também foram avaliados, entre eles: carga viral plasmática (CV), quantificação do parasitismo por *Leishmania*, níveis de lipopolissacarídeo (LPS), CD14 solúvel (sCD14), proteína intestinal ligadora de ácido graxo (IFABP) e o perfil de citocinas circulantes. Os pacientes LV/HIV-1 apresentaram contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> inferiores a 250 células/mm<sup>3</sup>, sem correlação com a CV e independente da fase clínica. Os maiores percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando CD38 foram observados nos pacientes coinfectados, comparados aos casos de HIV-1/AIDS e de LV apenas. Além disso, tais níveis permaneceram elevados apesar do uso de TARV e da menor carga parasitária pós-tratamento anti-leishmania. O acompanhamento prospectivo de um paciente LV/HIV-1 até longo tempo pós-tratamento para LV também mostrou a ausência de recuperação quantitativa e qualitativa da resposta imune celular, aliado à presença de lesões cutâneas concomitantes e episódio de reativação. Altos níveis de LPS foram observados nos casos de LV apenas, os quais se correlacionaram com a ativação de células T, sCD14, IFABP e citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que um produto bacteriano não associado à infecção por *Leishmania* e, de provável origem luminal, pode exercer um papel importante na imunopatogênese da LV. Os níveis de LPS também foram elevados na coinfeção LV/HIV-1 e embora não tenham sido superiores aos casos de HIV-1 apenas, se correlacionaram com o percentual de células T CD8<sup>+</sup> ativadas e com o perfil de citocinas pró-inflamatórias. Consistente com o *status* de ativação celular e comprometimento imune, os pacientes LV/HIV-1 apresentaram níveis elevados de células senescentes e alterações no repertório do TCR, sem a mobilização diferencial de uma determinada família V $\beta$  frente à coinfeção. Além disso, a análise prospectiva de cinco casos de LV/HIV-1 mostrou que o desfecho clínico da LV não pôde ser associado a um perfil de distribuição dos V $\beta$  (mono/oligo/policlonal). Nossos resultados sugeriram que a associação LV/HIV-1 resulta num efeito sinérgico *in vivo*, no qual o grau de ativação celular e o perfil de citocinas liberadas podem estar diretamente relacionados à infecção por *L. infantum* e suas consequências imunopatogênicas, bem como à atividade estimulatória do LPS. Estudos prospectivos poderão auxiliar a validar o papel desses parâmetros imunológicos no prognóstico da associação *Leishmania*/HIV.

## ABSTRACT

*Leishmania*/HIV co-infection has been considered an association in many regions around the world and the outcome of this disease is aggravated by immune impairment caused by both pathogens. Chronic immune activation is a hallmark of HIV-1 and *Leishmania infantum* infection separately. In this context, our aim was to evaluate the influence of *Leishmania* infection in the degree of quantitative and qualitative impairment of T lymphocytes and in the cellular activation of co-infected patients. In addition, we also evaluated microbial products associated with cellular activation in visceral leishmaniasis (VL) and in VL/HIV co-infection, as well as, the impact of immune reconstitution after antiretroviral therapy (ART) and anti-leishmania treatment in the recovery of specific immune response to VL. For this purpose, VL/HIV-1 co-infected patients were evaluated: twenty one cases in the active phase of VL and fourteen in the remission. Among VL/HIV-1 patients, seven cases are part of a longitudinal study and they are still in follow up until this moment. Individuals with VL (active and remission), HIV-1 infection and healthy subjects were also investigated as controls. The immune impairment was evaluated by the absolute counts of CD4<sup>+</sup> T cells, expression of molecules associated with cellular activation (CD38) and to replicative senescence/differentiation (CD57 and CD27), as well as, by the *ex vivo* and *in vitro* characterization of the variable regions of the beta chain (V $\beta$ ) of T cell receptor (TCR). Factors potentially associated with cellular activation were also assessed, such as: plasma viral load, *Leishmania* parasite load, lipopolysaccharide levels (LPS), soluble CD14 (sCD14), intestinal fatty acid binding protein (IFABP) and the profile of plasma cytokines. VL/HIV-1 co-infected patients presented counts of CD4<sup>+</sup> T cells lower than 250 cells/mm<sup>3</sup>, without correlation with viral load and independent of clinical phase of leishmaniasis. The highest percentages of CD8 T cells expressing CD38 were observed in co-infected patients, especially those with the visceral form of the disease, compared with HIV-1 and VL cases alone. Moreover, such high levels remained despite ART use and lower parasite load in the remission co-infected patients. The prospective analysis of one VL/HIV-1 patient until long term after anti-*Leishmania* treatment also showed the absence of quantitative and qualitative recovery of the cellular immune response, coupled with concomitant cutaneous lesions and reactivation episode. High levels of LPS were observed in VL cases alone, which correlated with T-cell activation, sCD14, IFABP and pro-inflammatory cytokines levels, suggesting that a bacterial molecule not associated with *Leishmania* infection, and probably from luminal origin may play an important role in the immunopathogenesis of VL. LPS levels were also elevated in VL/HIV-1 patients, and although no higher than HIV-1 cases, it were correlated with activated CD8<sup>+</sup> T cells and with inflammatory cytokines. Consistent with the cellular activation state and immune impairment, co-infected patients presented high levels of senescent cells and alterations in the TCRV $\beta$  repertoire, without the differential mobilization of any V $\beta$  for VL/HIV-1 co-infection. In addition, prospective analysis of five VL/HIV-1 cases showed the clinical outcome could not be associated with any V $\beta$  profile (mono/oligo/polyclonal). Our results suggested that VL/HIV-1 association results in a synergistic effect *in vivo*, in which the degree of cellular activation and the profile of cytokines may be directly related to *L.infantum* infection and its immunopathogenic consequences, along with the stimulatory LPS activity. Prospective studies may help to validate the role of these immunologic parameters in the prognosis of *Leishmania*/HIV co-infection.

# Capítulo 1

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Aspectos epidemiológicos da coinfeção *Leishmania*/HIV-1**

A leishmaniose representa um complexo de doenças com importância clínica e epidemiológica que afeta principalmente indivíduos de países em desenvolvimento. Esta protozoose ocorre em regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada uma das seis grandes endemias humanas (Alvar et al. 2012). Recentemente, uma revisão dos dados epidemiológicos sobre as leishmanioses revelou uma incidência anual de 0,2 a 0,4 milhões de casos de leishmaniose visceral (LV) e de 0,7 a 1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea (LC). Neste estudo, o Brasil continua aparecendo como um dos seis principais países no qual mais de 90% dos casos globais de LV ocorrem. Em relação à LC, o Brasil também está entre os dez principais países com os mais altos números de casos estimados (Alvar et al. 2012). Levando-se em conta as subnotificações e o crescimento da população mundial nos últimos vinte anos, pode-se considerar que estes números sejam ainda maiores do que os relatados.

Nas Américas, a leishmaniose é endêmica em 24 países situados desde o sul dos EUA, até o norte da Argentina, excetuando-se apenas o Uruguai e o Chile (Grimaldi Jr et al. 1989). No Brasil, a LV é uma doença endêmica, estando atualmente distribuída em 21 unidades federadas com média anual de 3.500 casos e com incidência de 1,8 por 100.000 habitantes em 2010 (Brasil, MS/SVS. 2011). A região Nordeste concentra mais de 50% dos casos e nos últimos anos a doença vem se expandindo para outras regiões brasileiras como Centro-Oeste, Norte e Sudeste, aonde novos focos vem sendo detectados, caracterizando um fenômeno de urbanização dessa doença, originariamente rural (Harhay et al. 2011). Vários fatores contribuem para esse processo, dentre eles a alteração do meio ambiente pelo homem, a qual favorece a adaptação e proliferação do vetor e de reservatórios da infecção, ou mesmo mudanças na ecologia e biologia do vetor (Costa. 2008) Recentemente, a correlação espacial entre as taxas de incidência da LV e indicadores socioeconômicos e demográficos avaliados em Teresina, no Piauí, também sugeriu que a introdução e manutenção da LV podem ser influenciadas pelas condições ambientais típicas de áreas com menor infraestrutura e desenvolvimento (de Almeida et al. 2011).

Ao mesmo tempo, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, o HIV, atinge hoje cerca de 33,3 milhões de pessoas ao redor do mundo, incluindo aquelas que



progrediram para a AIDS (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida), sendo o vírus do tipo 1 (HIV-1) o responsável majoritário por esta pandemia. A OMS estima que só no ano de 2009, 2,6 milhões de novos casos foram notificados e 1,8 milhões de pessoas foram a óbito (AIDS Epidemic Update - December 2010, UNAIDS). Na América Latina, essa pandemia atinge cerca de 1,4 milhões de indivíduos, com 92.000 novas infecções notificadas em 2009 e 58.000 óbitos devido à AIDS. De acordo com o último Boletim Epidemiológico (ano base 2010) foram notificados 608.230 casos de AIDS acumulados de 1980 a junho de 2011 e estima-se que existam cerca de 600.000 indivíduos portadores do vírus (Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde - 2011).

Diante desse elevado número de notificações de ambas as doenças não é surpreendente que a coinfeção *Leishmania*/HIV esteja emergindo como uma entidade patológica grave e cada vez mais frequente em várias regiões ao redor do mundo. A partir da década de 1980, quando o primeiro caso de leishmaniose associado com a infecção pelo HIV-1 foi publicado (De la Loma et al. 1985), um aumento no número de casos de coinfeção vem sendo registrado e atualmente 35 países são afetados pela coinfeção *Leishmania*/HIV-1, sendo a forma visceral a mais prevalente (Alvar et al. 2008, Nascimento et al. 2011).

O risco da coinfeção LV/HIV está correlacionado com mudanças no padrão de propagação das duas infecções: em certos países, a LV está se tornando mais urbanizada ocorrendo nos subúrbios de grandes cidades, como é observado na América do Sul, e simultaneamente a infecção pelo HIV-1 está se tornando progressivamente mais comum nas áreas rurais (Alvar et al. 2008). Tais alterações nos perfis epidemiológicos das duas doenças apontam para um maior risco da população frente às duas infecções.

A maioria dos casos de coinfeção na América é relatada no Brasil, onde foi relatado o primeiro caso de leishmaniose tegumentar em pacientes infectados pelo HIV (Coura et al. 1987). Segundo o cruzamento de dados de notificações ao SINAN já foram relatados no Brasil cerca de 326 casos de coinfeção *Leishmania*/HIV, no período de 2001 a 2006, dos quais 150 apresentaram a forma tegumentar da doença e 176 a forma visceral (Ministério da Saúde, 2011). Recentemente, Sousa-Gomes e colaboradores (2011) relataram que dos 7.556 casos de LV notificados no período de 2007 a 2008, 278 eram coinfectados com HIV-1, sugerindo um total de 454 casos desta associação desde 2001, e apontando a LV como a forma prevalente de leishmaniose no Brasil no que se refere à coinfeção. Em relação à categoria de exposição, o uso de drogas injetáveis encontra-se

em ampla expansão como fonte de transmissão, e cada vez mais o diagnóstico das duas infecções ocorre de forma simultânea, com a leishmaniose sendo responsável pela abertura do caso (Alexandrino-de Oliveira et al. 2010, Brasil/Ministério da Saúde, 2011).

O significado epidemiológico desta expansão simultânea, demonstrado por vários estudos, reside no fato de que os pacientes com HIV/AIDS que vivem em áreas endêmicas de leishmanioses, apresentam maior risco de manifestá-las e que a coinfeção *Leishmania*/HIV pode acelerar o curso clínico da infecção por HIV. Assim, as leishmanioses, em especial a forma visceral da doença, têm ganhado importância como infecção oportunista em pacientes com infecção por HIV, que vivem ou viveram em áreas consideradas endêmicas para essas parasitoses (Alvar et al. 2008). Embora a LV seja a terceira doença parasitária oportunista de maior prevalência entre os indivíduos infectados pelo HIV no Sul da Europa, ela ainda não é considerada uma doença indicadora de AIDS pela OMS. Dessa maneira, considerando este último fato e sabendo-se que o agravo é amplamente subnotificado, o real impacto da coinfeção *Leishmania*/HIV é provavelmente subestimado sob uma escala global.

### **1.1 Leishmaniose visceral: aspectos imunopatogênicos**

A ocorrência de diferentes formas clínicas de leishmaniose está na dependência de variáveis como, fatores ligados a espécies, cepas do parasito, hábito do vetor, além de diferenças na resposta imune e, conseqüentemente, de fatores resultantes da interação parasito-hospedeiro. Assim, a leishmaniose pode ser dividida clinicamente em leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LTA). Neste trabalho, o enfoque será na forma visceral da doença.

A LV, também conhecida como calazar, é uma forma sistêmica da doença, em que os parasitos apresentam acentuado tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, medula óssea e linfonodos. A espécie responsável pela LV no Brasil é a *Leishmania (Leishmania) infantum*, anteriormente chamada *L. chagasi* (Kuhls et al. 2011).

A imunopatogênese da LV é bastante complexa, já que envolve o comprometimento de diferentes órgãos do sistema imune gerando, em consequência, alterações em outros compartimentos. Inúmeros grupos vêm trazendo contribuições importantes para a compreensão da relação parasito-hospedeiro na LV e os principais estudos foram recentemente revistos (Saha et al. 2006, Goto & Prianti. 2009).

Primariamente, o intenso parasitismo dos macrófagos pela *L.infantum* leva à destruição dessa linhagem fagocítica. Conseqüentemente, pode ocorrer o desvio da produção pela medula óssea de outras células como eritrócitos, neutrófilos e plaquetas, causando anemia, neutropenia e hemorragias. Outros mecanismos como morte celular por ativação podem contribuir para a diminuição das contagens de células T e comprometimento funcional da resposta celular (Saha et al. 2006). Assim, a LV é caracterizada pela imunossupressão da resposta imune celular, a qual pode ser comprovada pela não-responsividade dos pacientes aos antígenos de *Leishmania* inoculados intradermicamente (teste de Montenegro) e redução da resposta proliferativa de células T auxiliares mediante estímulo com antígenos do parasito *in vitro* (Carvalho et al. 1989). A incapacidade de produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  pelas células mononucleares, e sua restauração após a quimioterapia é bem documentada (Carvalho et al. 1985). Entretanto, os mecanismos que levam a esta imunossupressão ainda são amplamente desconhecidos, embora se tenha a convicção de que antígenos do parasito são cruciais neste processo.

A LV está associada à produção de IL-4 e IL-10 que podem inibir a expansão de células do perfil tipo 1, e a ativação de macrófagos pelo IFN- $\gamma$  (Carvalho et al. 1994). A imunossupressão também pode prejudicar a função dos macrófagos, que diminuem a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I e II, bem como deixam de produzir IL-1 e TNF em resposta a estímulos (revisto por Saha et al. 2006).

Finalmente, indivíduos com LV autoresolutiva ou aqueles submetidos a uma quimioterapia bem-sucedida manifestam uma intensa resposta de hipersensibilidade tardia mediada por células e apresentam maiores proporções de células T CD4<sup>+</sup> Th1 específicas do que células T CD8<sup>+</sup> (revisto por Goto et al. 2004, Saha et al. 2006). Da mesma maneira, Carvalho e colaboradores (1994) mostraram que uma combinação de IL-2 e IFN- $\gamma$  exógeno restaurava a resposta linfoproliferativa, assim como, a combinação de anti-IL-4 e anti-IL-10 não só restaurava esta resposta, como também a produção de IFN- $\gamma$  em culturas de células de pacientes com LV. O aumento da produção de IL-12 após o tratamento para LV também auxilia na recuperação da produção de IFN- $\gamma$  (Bacellar et al. 2000). Esses dados indicam que uma mudança no perfil de resposta para o tipo 1 pode auxiliar a resolução da infecção na LV. Esta resposta tipo 1, quando exacerbada, parece estar implicada no desenvolvimento da leishmaniose dérmica pós-calazar, onde lesões cutâneas surgem após a resolução das alterações sistêmicas (revisto por Saha et al. 2006).

### 1.3. História Natural e Imunopatogenia da infecção pelo HIV-1

O curso clínico natural da infecção pelo HIV-1 é bem definido e divide-se em três fases: infecção primária ou aguda (período de tempo a partir da infecção inicial pelo HIV-1 até o desenvolvimento da resposta de anticorpos), fase assintomática ou de latência clínica e fase sintomática, onde surgem as doenças que definem a AIDS (revisito por Pantaleo & Fauci. 1996). A infecção primária tem início com a transmissão do vírus e caracteriza-se por altos níveis de replicação viral acompanhada por uma queda significativa do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> circulantes e sintomas clínicos inespecíficos, comuns a diversas outras viroses. A fase assintomática tem início com o controle da replicação viral e prolonga-se por sete a 10 anos. Esta é caracterizada pela perda contínua e gradual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, cujos valores não serão mais recuperados em ausência de terapia. Uma vez atingidos valores inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup>, instala-se um quadro de imunodeficiência grave, com o desenvolvimento e/ou reaparecimento de diversas infecções oportunistas causadas por vários patógenos, além de neoplasias, que definem a fase sintomática ou a AIDS, a qual culmina com o óbito do indivíduo, em ausência de tratamento. Para a maioria dos indivíduos infectados, os chamados progressores típicos, este é o curso clínico observado para a infecção (Pantaleo & Fauci. 1996). Os indivíduos infectados que não progridem para AIDS e mantêm contagens de células T CD4<sup>+</sup> dentro da normalidade, com carga viral baixa em ausência de terapia antiretroviral (TARV), são chamados não-progressores de longo termo (Poropatich et al. 2011).

O HIV-1 infecta células que expressam a molécula CD4, bem como, os receptores de quimiocinas, CCR5 e CXCR4, identificados como importantes coreceptores virais (Feng et al. 1996). A distribuição desses coreceptores permite não só a infecção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, bem como de células centrais para a apresentação de antígenos, como macrófagos e células dendríticas. Considerando que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> desempenham um papel central no desenvolvimento da resposta imune específica contra o vírus, pode-se afirmar que a perda progressiva no número destas células favorece o estabelecimento do quadro de imunodeficiência grave observada nesses pacientes (Pantaleo & Fauci 1996, Grossman et al. 2002). Dessa forma, a contagem das células T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico é o principal parâmetro imunológico utilizado no acompanhamento da infecção pelo HIV-1, contribuindo para a avaliação da progressão da doença, início de profilaxias para as

doenças oportunistas e para a submissão à TARV, além de também ser utilizada na avaliação da reconstituição imune pós-tratamento (Autran et al. 1997, Miller et al. 1999).

A perda progressiva de células T CD4<sup>+</sup> é o evento mais característico da infecção, entretanto os mecanismos precisos envolvidos são multifatoriais. Dados da literatura já demonstraram que a infecção e morte direta dessas células pelo vírus contribuem parcialmente para essa depleção (Douek et al. 2002), uma vez que mesmo após a TARV, a recuperação de células T CD4<sup>+</sup> pode ser incompleta, apesar da supressão da carga viral para níveis abaixo de 50 cópias/ml (Anthony et al. 2003, Lederman et al. 2003). Isso nos sugere que efeitos indiretos da infecção viral sobre o sistema imune também são importantes. Dessa maneira, outros mecanismos também têm sido apontados como responsáveis por essa perda contínua, entre eles: o movimento alterado de células T para os órgãos linfoides secundários, levando a uma aparente perda de células T, com mudanças no número e proporção de suas subpopulações na circulação, e a profunda ativação do sistema imune (revisto por McCune. 2001). Além disso, células T CD4<sup>+</sup> infectadas também podem ser destruídas como consequência da resposta imune específica ao vírus, entre eles, a resposta de linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e resposta de células *natural killer* (McCune, 2001).

Em adição à depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, verifica-se durante a infecção aguda pelo HIV-1, uma intensa replicação viral, alcançando níveis de 100 milhões de cópias de RNA/ml de plasma, ainda em ausência de uma resposta imune celular específica (Pantaleo e Fauci. 1996, Picker. 2006). Neste período bastante inicial de replicação do vírus ocorrem processos imunopatogênicos importantes, como a sua disseminação para uma grande variedade de tecidos linfoides secundários, que funcionarão como reservatórios para a infecção e contribuirão para a latência viral (Stevenson. 2003). Durante o longo período de latência clínica, o HIV se replica continuamente, sendo o tecido linfoide o principal sítio de replicação do vírus (Pantaleo et al. 1991, Pantaleo et al. 1993). Pantaleo e colaboradores (1993) foram um dos primeiros pesquisadores a verificar que a presença de células contendo DNA proviral é muito maior no tecido linfoide do que nas células mononucleares circulantes no sangue periférico, sugerindo que a infecção pelo HIV é ativa e progressiva por todo o curso da infecção.

Deste modo, a quantificação do RNA viral no sangue periférico, denominada carga viral plasmática, é outro importante marcador laboratorial para o acompanhamento da infecção, traduzindo a intensa replicação do vírus no indivíduo. A determinação da

carga viral também é importante para monitorar a eficácia da TARV sobre a replicação do vírus (Gea-Banacloche e Clifford-Lane, 1999, Havlir et al. 2003).

Embora a infecção pelo HIV seja majoritariamente em células T CD4<sup>+</sup>, alterações importantes também são observadas na subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Já no período inicial da infecção, ainda na fase aguda, observa-se um aumento das contagens absolutas de células T CD8<sup>+</sup>, que persiste durante a fase assintomática. Este aumento inicial é, em parte, resultado da indução de uma intensa resposta de células T citotóxicas específicas para o HIV-1, a qual coincide com a supressão inicial da viremia para a grande maioria dos pacientes, mostrando que o hospedeiro é capaz de gerar uma resposta imune eficiente no controle inicial da replicação viral (revisto por Benito et al. 2004). Por outro lado, este aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> também é resultado do processo de ativação generalizada do sistema imune (Lawn et al. 2001). Atualmente é bastante aceito que a qualidade da resposta imune ao vírus, e não apenas a quantidade, está diretamente relacionada à progressão para a AIDS. Neste contexto, uma resposta específica compreendida de células polifuncionais capazes de secretar mais de uma citocina, ajuda a entender algumas diferenças entre indivíduos progressores e os chamados não progressores, no que se refere ao controle da replicação viral (Betts et al. 2006, Douek et al. 2009).

A introdução do AZT em 1989, seguido das diversas drogas e esquemas terapêuticos implementados desde então, teve um grande impacto na mortalidade e morbidade dos pacientes vivendo com HIV/AIDS. A terapia antiretroviral combinada altamente potente (TARV), constituída por inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (NRTIs) e inibidores de protease (PIs) ou inibidores de transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (NNRTIs), foi introduzida a partir de 1996 e permitiu a adoção de esquemas múltiplos de terapia que possibilitaram uma redução importante e significativa da carga viral por um tempo prolongado (Li et al. 1998), assim como, a redução das infecções oportunistas, além de uma melhora da qualidade de vida (Lawn et al. 2001) dos pacientes HIV positivos. Além da reconstituição imune, também foi evidenciada durante a TARV uma nova entidade clínica, definida por uma reação inflamatória intensa que surge associada ao processo de restauração imune, tendo como alvo infecções tratadas previamente ou infecções subclínicas (Martin-Blondel et al. 2012). Esta manifestação ficou conhecida como síndrome inflamatória da reconstituição imune (IRIS).

O aumento numérico de células T CD4<sup>+</sup> circulantes foi bem descrito, porém muito ainda precisa ser esclarecido sobre as características fenotípicas, as especificidades e as funções dessas novas células, quando oriundas de um *output* tímico que contribui para a formação desse novo repertório. É importante destacar que o grau de recuperação imune obtido pela TARV é altamente variável e depende dos níveis basais de T CD4<sup>+</sup> anteriores ao início da terapia (Lange et al. 2002, D'Amico et al. 2005). Além disso, pode ocorrer discordância imunológica (recuperação subótima da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>) mesmo em pacientes com carga viral plasmática indetectável (Goicoechea et al. 2006).

## **2. Ativação do sistema imune e doenças inflamatórias e infecciosas**

A fase efetora de uma resposta imune adaptativa é dependente de um processo denominado ativação linfocitária, cuja primeira etapa é o reconhecimento de um antígeno por um linfócito específico (revisto por Bonilla et al. 2010). No que se refere aos linfócitos T, o receptor de células T (TCR) reconhece o antígeno específico na forma de um complexo peptídeo-MHC (complexo principal de histocompatibilidade) presente na superfície das células apresentadoras de antígeno. Por sua vez, o reconhecimento antigênico pelos linfócitos B é realizado pelo receptor de células B (BCR) composto pelas imunoglobulinas IgM e IgD (Bonilla et al. 2010).

A ativação dos linfócitos T ocorre mediante o reconhecimento do seu antígeno específico e transdução dos sinais disparados pelo complexo do TCR (primeiro sinal), e pelo segundo sinal via moléculas co-estimulatórias. Já a ativação dos linfócitos B pode ser dependente ou independente dos linfócitos T (Bonilla et al. 2010). Em ambas as respostas, humoral ou celular, o processo de ativação inicia uma sequência de eventos bioquímicos que resultam na transcrição de genes particulares e na entrada da célula no ciclo celular, o que explica o elevado *turnover* de células mediante a ativação do sistema imune (Pearce. 2010). Essa intensa proliferação celular resulta na expansão dos clones específicos para o antígeno e diferenciação em células efetoras. Os genes expressos após o reconhecimento antigênico e ativação linfocitária irão codificar proteínas capazes de mediar as respostas imunes, entre elas, as citocinas. As células T recém-ativadas podem migrar para o sítio da infecção ou inflamação, aonde desempenham suas funções efetoras, com o objetivo de eliminar a fonte do antígeno. As células B se diferenciam em plasmócitos secretores de

imunoglobulinas, as quais serão responsáveis pela fase efetora da resposta imune humoral (Allen et al. 2007).

Após a eliminação do antígeno, a resposta imune declina o que é de extrema importância para o retorno do sistema imune para um estado de repouso, isto é em homeostase. Tal resposta declina principalmente porque a maioria das células morre por apoptose, devido à ausência de sinais de sobrevivência fornecidos pelo antígeno, moléculas co-estimulatórias e citocinas produzidas durante as reações imunes (Bonilla et al. 2010). No entanto, uma progênie dos linfócitos inicialmente ativados dá origem às células de memória (Cui et al. 2010).

A memória imunológica se refere à capacidade do sistema imune responder a um segundo desafio antigênico de forma quantitativa e qualitativamente mais rápida e eficiente. As células T de memória podem ser divididas em duas subpopulações segundo seu padrão migratório: células T de memória central ( $T_{MC}$ ) e células T de memória efetora ( $T_{ME}$ ). As células  $T_{MC}$  expressam moléculas tais como CCR7 e CD62L, as quais permitem um eficiente endereçamento aos linfonodos, enquanto as células  $T_{ME}$  perdem a expressão desses receptores e estão localizadas no sangue, baço e órgãos não-linfoides (revisado por Seder et al. 2003). As células  $T_{ME}$  representam um *pool* de células de memória prontamente disponíveis, capazes de entrar nos tecidos periféricos para mediarem reações inflamatórias ou de citotoxicidade e conterem o organismo invasor. Por outro lado, as células  $T_{MC}$  podem se diferenciar em células  $T_{ME}$  após reestimulação através do TCR e receptores de citocinas, mantendo um repertório diverso de células de memória específica. Após um segundo desafio são capazes de gerar uma nova onda de células efetoras (Sallusto et al. 1999).

A ativação da resposta imune inata também é de fundamental importância, uma vez que é responsável por ativar e influenciar o tipo de resposta adaptativa que irá se desenvolver (Liu et al. 2010). Os micro-organismos patogênicos e/ou seus produtos que ultrapassam as barreiras naturais do organismo são reconhecidos por células da imunidade inata através dos seus receptores de reconhecimento padrão (PRR). Estes receptores, dentre os quais os Toll-like receptors (TLR) são os mais conhecidos, reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPS) e estão localizados na membrana externa ou internamente de vários tipos celulares (Liu et al. 2010). O estímulo dos PRR pelos PAMPS dispara uma cascata de sinalização intracelular que culmina na expressão e secreção de uma variedade de citocinas pro-inflamatórias (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF), as quais



iniciam a resposta do hospedeiro, bem como ativam e modulam a subsequente resposta linfocitária (Mogensen. 2009). Nesse contexto, qualquer produto de origem microbiana é capaz de ativar o sistema imune seja direta ou indiretamente.

Vários mecanismos de ativação do sistema imune vêm sendo descritos nas doenças infecciosas ou não-infecciosas, muitas vezes dirigido pelo estímulo antigênico e/ou independentes do antígeno. Entre as doenças infecciosas, sabe-se que, por exemplo, a malária se apresenta com uma intensa ativação do sistema imune. Na malária grave por *Plasmodium falciparum* e por *vivax*, a maioria das consequências patológicas descritas parece decorrer de um estado inflamatório exacerbado ao lado de um desequilíbrio no perfil de citocinas (Clark et al. 2006, Andrade et al. 2010).

A não limitação do grau de ativação do sistema imune pode trazer consequências importantes para o indivíduo, como é observado na sepse, cuja origem é infecciosa (Fry. 2012). A proteína MIF (fator de inibição da migração de macrófagos) tem emergido como uma importante citocina presente nas respostas imunes inflamatórias (Bacher et al. 1996). Esta foi primeiramente descrita como sendo um produto dos linfócitos T, no entanto, monócitos e macrófagos já foram demonstrados como a principal fonte de MIF após a estimulação com LPS (lipopolissacarídeo) e toxina-1 da síndrome do choque tóxico-TSST-1 (Calandra et al. 1994 e 1998). Uma vez liberado, MIF induz a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios como IL-6 e IL-8 aumentando a ativação do sistema imune (Bacher et al. 1996). Altos níveis de MIF já foram observados em pacientes com sepse grave ou choque séptico (Calandra et al. 2000) e por isso, vem sendo considerado um indicador de gravidade e mau prognóstico (Bozza et al. 2004). Além disso, o MIF pode influenciar a patogênese de várias doenças infecciosas, cuja tendência comum é participar do controle do parasito, mas ao mesmo tempo promover um dano tecidual e uma intensa inflamação sistêmica (Bozza et al. 2012).

Os mecanismos de ativação e a perda e/ou ausência de um controle adequado da resposta imune podem contribuir para o desenvolvimento e agravamento de algumas doenças de origem não-infecciosa (Harrison et al. 2011). Na doença inflamatória do intestino (IBD, do inglês *intestinal bowel disease*) existe uma alteração na composição e na função das células da imunidade inata presentes na lamina própria intestinal. A patologia característica dessa doença é suportada pelos níveis elevados de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF) e quimiocinas produzidos, que por sua vez ativam outras populações de células imunes inatas e linfócitos. É possível observar tal infiltrado inflamatório no tecido

inflamado de pacientes que sofrem de IBD (Kaser et al. 2010). De forma similar, a doença de Crohn e a colite ulcerativa também estão associadas a uma perda do equilíbrio entre os mecanismos anti e pró-inflamatório mantidos na homeostase do trato gastrointestinal (Harrison et al. 2011). Além disso, a presença de LPS na circulação periférica de indivíduos que sofrem de algum tipo de IBD sugere que o dano intestinal permite a passagem deste antígeno, bem como o envolvimento deste na geração de uma resposta inflamatória (Caradonna et al. 2000).

## **2.1 Infecção pelo HIV-1 – modelo de ativação crônica do sistema imune**

A ativação crônica do sistema imune é uma das principais características da infecção pelo HIV-1. Atualmente é amplamente aceito que este processo está diretamente relacionado à progressiva depleção de células T CD4<sup>+</sup> e conseqüentemente à progressão para a AIDS (Douek et al. 2009). A princípio esta ativação celular não seria diferente daquela observada frente a outros patógenos sistêmicos, refletindo a montagem de uma resposta imune antiviral. No entanto, na infecção pelo HIV-1, a ativação persiste indefinidamente, enquanto nas demais infecções ela declina ou é adequadamente controlada (Picker. 2006).

Vários mecanismos podem contribuir para a ativação do sistema imune na infecção pelo HIV-1, sejam eles direto ou indiretamente relacionados ao vírus. Adicionalmente, tais mecanismos não são mutuamente exclusivos e, portanto, podem ocorrer concomitantemente (Douek et al. 2009).

A íntima relação entre os níveis de ativação e a depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> se torna mais clara em estudos experimentais com primatas não-humanos. A infecção pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV) nos chamados hospedeiros naturais (macacos verde africanos e os *sooty mangabeys*) se apresenta com alta viremia, baixos níveis de ativação imune e sem qualquer imunodeficiência (Silvestri et al. 2005 ). Entretanto, a infecção por SIV nos macacos *rhesus*, cuja infecção é bem similar a que ocorre nos humanos, resulta na depleção de T CD4<sup>+</sup> e progressão mais rápida para a AIDS. Isso sugere que, de fato, a hiperativação desempenha uma função central na patogênese da infecção pelo HIV-1.

Este ambiente de desorganização do sistema imune pode ser reconhecido nos indivíduos infectados pelo HIV-1 por 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. Essa expressão, em especial da molécula CD38, está associada à progressão da doença, e a avaliação periódica do fenótipo dessas células pode auxiliar no monitoramento da infecção. Alguns estudos demonstraram que o percentual de células T CD8<sup>+</sup> expressando a molécula CD38 aumenta progressivamente com o avanço da doença e que este aumento está associado com o declínio de células T CD4<sup>+</sup> totais e aumento da carga viral plasmática (Benito et al. 1997, Giorgi et al. 2002, Benito et al. 2004). Por sua vez, os níveis de células CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> circulantes que se correlacionam fortemente com os níveis de RNA plasmático, podem diminuir com a supressão da replicação viral obtida pela TARV (Benito et al. 2004). Entretanto, vários estudos já verificaram que mesmo sob TARV e com a carga viral controlada ou indetectável, os níveis de ativação podem permanecer elevados (Anthony et al. 2003, Lederman et al. 2003, Nies-Kraske et al. 2009). Dessa maneira, os níveis de ativação vêm sendo considerados preditores mais fidedignos da progressão para a AIDS, do que a própria carga viral (Giorgi et al. 1999).

Assim, a estimulação antigênica fornecida pela replicação viral está diretamente relacionada à ativação imune (Benito et al. 2004). Entretanto, considerando que a frequência de células T específicas para o HIV-1 é pequena dentro do percentual total de células com fenótipo ativado (Brenchley et al. 2006a) e que a proliferação celular permanece elevada mesmo em indivíduos com carga viral indetectável (Anthony et al. 2003), a replicação viral não pode ser considerada como a única responsável pelo alto grau de ativação nesses indivíduos. Dessa maneira, outros mecanismos indiretamente relacionados ao vírus já foram implicados nesse processo, entre eles, a presença de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-6, IL-1 $\beta$  e quimiocinas como RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  (Fahey, 1998, Lawn et al. 2001). Além disso, Eggena e colaboradores (2005) relataram que a depleção de células T reguladoras durante o curso da infecção pelo HIV-1 também poderia contribuir para o estado imune ativado em pacientes sem TARV. Recentemente, um alto percentual de células T reguladoras foi observado em pacientes infectados pelo HIV-1 sob TARV, com contagens de T CD4<sup>+</sup> menor do que 500 células/ $\mu$ l, o que sugere uma tentativa do sistema imune conter o grau de ativação (Piconi et al. 2011). Por fim, polimorfismos nos genes que codificam para citocinas inflamatórias também devem ser considerados no estado geral de ativação (Haas et al. 2006).

## 2.2 Sistema imune de mucosa e ativação celular na infecção pelo HIV-1

Recentemente, Brenchley e colaboradores (2006b) propuseram que a translocação de produtos microbianos do lúmen intestinal para a circulação sistêmica poderia se constituir em outro mecanismo central para a patogênese e ativação imune na infecção pelo HIV-1. Estudos anteriores já verificaram alterações histológicas e imunológicas no sistema imune de mucosa de indivíduos infectados pelo HIV-1 (Kolter et al. 1984). Neste contexto, pacientes HIV positivos apresentam sintomas característicos de uma enteropatia com diarreia, má absorção e presença de infiltrado inflamatório, bem como atrofia das vilosidades e hiperplasia de criptas no tecido mucoso (Brenchley & Douek. 2008). Posteriormente, observou-se que essa enteropatia durante a fase aguda da infecção pelo HIV-1 era acompanhada por uma depleção massiva de células T CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> ativadas de memória efetora, localizadas predominantemente no trato gastrointestinal (Brenchley et al. 2004, Mehandru et al. 2004). Essa depleção é principalmente atribuída à intensa replicação viral que ocorre na fase aguda. De fato, infecções por SIV em macacos *rhesus* também verificaram resultados semelhantes (Veasey et al. 1998, Mattapallil et al. 2005). Esta perturbação imune no tecido linfóide associado à mucosa leva a danos anatomo-funcionais na barreira da mucosa intestinal, que em condições normais é responsável por proteger e evitar a passagem da flora comensal ou até mesmo de organismos potencialmente patogênicos, para a lâmina própria e linfonodos mesentéricos (Brenchley et al. 2006b).

A consequência direta deste comprometimento da integridade da barreira gastrointestinal é a translocação de produtos microbianos para a circulação (Brenchley et al. 2006b, Douek et al. 2009). Esses componentes bacterianos podem estimular as células da imunidade inata por meio dos seus ligantes de receptores Toll, tais como LPS, flagelina e motivos CPG (Gioannini et al. 2007). O LPS se liga 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- $\kappa$ B e com a produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF e IFN do tipo I, que por sua vez, 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 forma coerente com o que foi proposto, níveis aumentados de LPS foram observados em pacientes infectados pelo HIV-1 na fase crônica comparados aos indivíduos saudáveis e àqueles na fase aguda da doença. Estes níveis de LPS foram associados aos níveis de CD14 solúvel, aos níveis plasmáticos da citocina pró-inflamatória IFN- $\alpha$  e com o

percentual de linfócitos T com fenótipo ativado (Brenchley et al. 2006b). Um estudo recente verificou que os níveis de CD14 solúvel podem prever a mortalidade em pacientes infectados pelo HIV-1 sob TARV, independente das contagens de T CD4<sup>+</sup> e da carga viral (Sandler et al. 2011b). 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). Níveis elevados de LPS circulantes também já foram demonstrados em pacientes com demência associada à AIDS, sugerindo que a translocação de produtos microbianos para a periferia pode exercer um importante papel na ativação de monócitos capazes de migrarem para o cérebro (Ancuta et al. 2008).

Os mecanismos subjacentes à translocação microbiana ainda não estão totalmente definidos, entretanto, a apoptose de enterócitos mediada pelo vírus e por mecanismos indiretos à replicação viral é considerada um dos fatores que contribuem para esse processo, pois leva a um aumento da permeabilidade intestinal (Li et al. 2008). O dano intestinal pode ser indiretamente avaliado pelos níveis plasmáticos da proteína IFABP (*intestinal fatty acid binding protein*), localizada no citoplasma do enterócito e cuja liberação é dependente do comprometimento da célula (Lieberman et al. 1997). Sandler e colaboradores (2011) verificaram que os níveis de IFABP se encontravam aumentados em pacientes HIV positivos e que estes estavam associados negativamente com as contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> iniciais (*nadir*), sugerindo que quanto maior o dano intestinal, menor as contagens de T CD4<sup>+</sup> antes do início da TARV.

A perda preferencial de células Th17 no trato gastrointestinal de indivíduos infectados pelo HIV-1 também já foi proposta como um mecanismo crucial para a perda da homeostase dos enterócitos, já que a citocina IL-17 secretada por esta subpopulação é importante na defesa contra bactérias e fungos nas superfícies mucosas e na proliferação dos enterócitos (Brenchley & Douek. 2008). De fato, na infecção por SIV em hospedeiros naturais este compartimento celular encontra-se preservado (Brenchley & Douek. 2008).

A identificação da perda da integridade da barreira intestinal associada à passagem de produtos microbianos e indução da ativação imune foi demonstrada de forma elegante por Estes e colaboradores (2010). Neste estudo, a utilização de técnicas de imunohistoquímica em espécimes teciduais de macacos *rhesus* cronicamente infectados por SIV permitiu a observação de LPS na lamina própria e nos linfonodos mesentéricos e axilares, bem como a colocalização com as citocinas IFN- $\alpha$  e IL-18. Em adição, a

coloração da proteína claudina-3 nas junções do tipo *tight* revelou a perda epitelial da barreira de mucosa nesses animais, diferentemente do que foi observado na infecção dos hospedeiros naturais, onde as junções se encontravam preservadas. Paralelamente, demonstrou-se *in vitro* a diminuição da resistência transepitelial (RT) de uma linhagem celular intestinal frente a cepas laboratoriais X4 e R5 do HIV-1 (Nazli et al. 2010). Este fato estava correlacionado à interrupção das proteínas claudina, ocludina e ZO-1 nas junções do tipo *tight* e pela produção aumentada de TNF pelas células epiteliais da monocamada. A neutralização do TNF reverteu o efeito da diminuição da RT e diminuiu a translocação microbiana (Nazli et al. 2010).

Assim, é sabidamente aceito que a profunda depleção de células T CD4<sup>+</sup>, bem como a intensa replicação viral ocorre nos tecidos linfoides (linfonodos, placas de Peyer e lamina própria) ainda na fase aguda da infecção pelo HIV-1. Tais eventos estão associados ao dano estrutural e imunológico causado no tecido linfóide associado à mucosa (GALT), o qual favorece o fenômeno da translocação microbiana que perdura durante toda a fase crônica da doença e pode contribuir para a persistência do grau de ativação local e periférica do sistema imune (Douek et al. 2009). Neste cenário, a ativação imune leva a um consequente processo de fibrose, que se caracteriza pelo desequilíbrio entre os mecanismos de degradação e deposição de componentes da matriz extracelular, entre eles, o colágeno. O processo fibrótico culmina na destruição da arquitetura linfóide, o qual por sua vez, limita a reconstituição das células T CD4<sup>+</sup> por alterar o nicho de sobrevivência e crescimento dessas células (Schacker et al. 2002). Tal fibrose que leva gradualmente à perda da função dos tecidos linfoides na infecção pelo HIV-1 é similar àquela que ocorre na patogênese da cirrose nas infecções crônicas pelos vírus da hepatite B e C.

A extensão da deposição de colágeno já foi associada negativamente ao número de células T *naive* no tecido linfóide de indivíduos HIV-1 positivos (Schacker et al. 2006) e recentemente este mesmo grupo verificou que tal deposição limitou a reconstituição imune no intestino (Estes et al. 2008), ratificando o valor preditivo do processo de fibrose na depleção e recuperação de T CD4<sup>+</sup> nos tecidos linfoides. Além disso, o processo fibrótico pode ajudar a prever o grau de reconstituição das células T CD4<sup>+</sup> periféricas (Schacker et al. 2005). Embora a introdução da TARV na fase inicial da infecção pelo HIV-1 possa ajudar a restaurar a população de células T CD4<sup>+</sup> (George et al. 2005), a maioria dos estudos verificou que os sítios efetores do GALT não são reconstituídos (Mehandru et al. 2006).

A taxa de reconstituição dessas células T CD4<sup>+</sup> depletadas da mucosa define a taxa de progressão para AIDS em macacos *rhesus* infectados por SIV (Picker et al. 2004). Por outro lado, os hospedeiros naturais da infecção, que também perdem uma fração importante de células T CD4<sup>+</sup> do trato gastrointestinal na fase aguda da infecção por SIV, apresentam níveis baixos de LPS e ativação celular na presença de alta viremia e não progridem para AIDS. Isso sugere a presença de mecanismos imunológicos capazes de manter a integridade da mucosa e controlar patógenos oriundos desse local, bem como a consequente resposta inflamatória (Brenchley et al. 2006a, Gordon et al. 2007).

Dessa maneira, pode-se dizer que a intensa replicação viral na fase aguda da infecção inicia o processo de ativação do sistema imune e depleção de T CD4<sup>+</sup> na mucosa, com consequente translocação de produtos microbianos para a circulação. Este processo por sua vez, alimenta a ativação sistêmica na fase crônica da infecção, com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e proliferação celular gerando novos alvos para o vírus. Assim, perpetua-se a replicação viral, a depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a enteropatia e a própria ativação do sistema imune num verdadeiro ciclo vicioso (Douek et al. 2009). Estratégias terapêuticas que objetivem diminuir a propagação viral na mucosa e os efeitos deletérios de ativação celular, ao lado de agentes anti-inflamatórios e/ou anti-fibróticos são extremamente necessários para reduzir a mortalidade e melhorar a condição clínica dos pacientes HIV positivos.

### **2.3 Coinfecções – cofatores da ativação celular**

A estimulação antigênica exercida por outras infecções crônicas vem sendo considerada como um importante cofator para o estado geral de ativação imune e patogênese em indivíduos concomitantemente infectados pelo HIV-1. Assim, a coinfecção com certos micro-organismos oportunistas, incluindo, bactérias, protozoários, fungos e outros vírus pode não somente interferir diretamente na patogênese e morbidade, mas também desempenhar um importante papel na suscetibilidade e/ou na progressão da infecção pelo HIV em direção à AIDS (Bentwich, 1995 e 1996). Além disso, o comprometimento imunológico ao lado da depleção de células T CD4<sup>+</sup> na infecção pelo HIV-1 pode contribuir para a reativação e/ou persistência de vários patógenos.

No que diz respeito à coinfecção HIV/*Mycobacterium tuberculosis* níveis elevados de ativação celular, porém similares aos seus controles HIV positivos foram

observados em pacientes coinfectados. Tais níveis foram maiores quando comparados aos controles apenas com tuberculose e indivíduos saudáveis (Rodrigues et al. 2003). Recentemente, Giacoia-Gripp e colaboradores (2011) verificaram altos percentuais de células HLA-DR<sup>+</sup> na população de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e de CD38<sup>+</sup> em T CD8<sup>+</sup> em pacientes com coinfeção HIV/*M.leprae*. Neste estudo, particularmente, seis pacientes coinfectados foram identificados em IRIS, e apresentaram um aumento nos níveis de ativação num momento anterior à reação inflamatória e uma queda após o tratamento com corticóide.

Os pacientes coinfectados com malária por *P. falciparum* também apresentaram níveis aumentados de ativação linfocitária em relação aos monoinfectados com HIV-1 ou com malária. Considerando que a malária também leva a uma intensa ativação de células T CD4<sup>+</sup>, esses resultados sugeriram uma potencialização dos níveis de ativação nos pacientes concomitantemente infectados pelo HIV-1 (Chavale et al. 2012).

Outras infecções virais persistentes também podem agir como importantes cofatores para a maior ou menor progressão da infecção pelo HIV-1. Coinfecções com os vírus da hepatite B (HBV), C (HCV) e G (GBV-C) são frequentemente encontradas devido a rotas de transmissão similares (sexual, parenteral e vertical). O percentual de células T CD8<sup>+</sup> específicas para *citomegalovirus* (CMV) e para o vírus Epstein-barr (EBV) encontra-se ativado em pacientes coinfectados pelo HIV-1 (Doisne et al. 2004).

Um estudo prévio realizado com pacientes coinfectados HIV/HTLV-1 revelou que apesar de valores normais de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a subpopulação de células *naive* se encontrava diminuída, aliada a um elevado grau de ativação celular (Gudo et al. 2009). Estudos futuros poderão esclarecer se estas modificações poderão ser consideradas preditoras de uma progressão mais rápida para a AIDS. Por outro lado, já se observou uma menor progressão da infecção pelo HIV-1 em pessoas coinfectadas com o GBV-C. Os principais mecanismos propostos foram a manutenção do perfil de citocinas do tipo 1 em pacientes coinfectados, favorecendo uma resposta anti-HIV, o que não foi encontrado em pacientes apenas HIV positivos (Nunnari et al. 2003) e uma segunda hipótese seria a habilidade do GBV-C inibir a entrada e posterior difusão do HIV-1 pelo bloqueio do coreceptor de entrada viral, o CCR5 (revisto por Northfield et al. 2005). Recentemente, a replicação do GBV-C foi associada a uma menor ativação de células T em indivíduos recentemente infectados pelo HIV-1, independente da carga viral e contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Maidana-Giret et al. 2009).



## 2.4 Ativação celular e resposta pró-inflamatória na leishmaniose visceral - implicações na imunopatogenia da coinfeção *Leishmania*/HIV-1

O conceito de que a LV cursa com um intenso grau de ativação do sistema imune é cada vez mais consistente (Goto & Prianti. 2009, Costa et al. 2010). De forma paradoxal, este fenômeno é concomitante ao estado de imunossupressão que ocorre durante a fase ativa da doença (Saha et al. 2006, Goto & Prianti. 2009). Além disso, o processo de ativação celular não está diretamente relacionado à resolução da infecção, uma vez que a infecção progride mesmo na presença de níveis elevados de citocinas importantes para o controle e eliminação do parasito (Melby et al. 2001, Peruhype-Magalhães et al. 2006). A presença de mecanismos deativadores concomitantes à ativação celular, com a liberação de IL-10 e TGF- $\beta$  capazes de agir sobre os macrófagos e permitir a replicação do parasito foram recentemente revisados (Goto & Prianti. 2009).

Outro importante mecanismo sabidamente conhecido por ocorrer na fase ativa da LV é a ativação policlonal de células B. A produção de uma grande quantidade de anticorpos específicos ou não aos antígenos de *Leishmania*, logo após a infecção e anterior ao desenvolvimento das anormalidades celulares é bem documentada na LV (Neogy et al. 1987, da Matta et al. 2000, Atta et al. 2004). Estes últimos trabalhos demonstraram a presença de vários isotipos de imunoglobulinas, como IgM, IgE, IgG e as subclasses de IgG. Entretanto, o papel desses níveis elevados de anticorpos no que se refere à patogênese ou à proteção ainda não está definido. Calda e colaboradores (2005) também verificaram altos níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em todas as subclasses nos pacientes de LV. Estes níveis declinaram após o tratamento, embora para valores de absorvância ainda maiores do que o *cut-off* estabelecido. Adicionalmente, a presença dessas imunoglobulinas em grande quantidade pode contribuir para níveis aumentados de complexos imunes circulantes (Galvão-Castro et al. 1984).

Finalmente, umas das principais consequências de um sistema imune ativado é a presença de uma resposta inflamatória (Mogensen et al. 2009). De fato, vários estudos anteriores verificaram a presença de citocinas pró-inflamatórias durante a fase ativa da LV, dentre elas, a IL-8, TNF e IL-6 (Barral-Neto et al. 1991, Peruhype-Magalhães et al. 2006, Nylen et al. 2007). Níveis plasmáticos aumentados de IL-10 e IFN- $\gamma$  também já foram observados em pacientes de LV com doença ativa, levando um determinado tempo para retornar aos níveis basais após o tratamento específico (Caldas et al. 2005).

A ativação do sistema imune na LV também já foi associada às alterações em órgãos não-linfóides, como pulmão (Duarte et al. 1989), fígado (El Hag et al. 1994) e rim (Dutra et al. 1985), o que ratifica a existência de mecanismos imunes lesivos na presença de uma intensa ativação celular. Geralmente, as alterações renais observadas em pacientes com LV está relacionada à deposição de complexos imunes (Dutra et al. 1985). A patogênese da glomerulonefrite foi recentemente estudada na LV canina e a presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, bem como de antígenos parasitários foram implicados no processo (Costa et al. 2000 e 2003).

O conceito de que o substrato patogênico na LV pode incluir a resposta inflamatória sistêmica associada à falência múltipla dos órgãos faz dessa doença algo muito similar ao que ocorre na sepse. Um estudo de caso controle realizado em pacientes de LV no Piauí revelou que os fatores de risco para morte na LV correlacionavam-se com a ação clínica de várias citocinas pró-inflamatórias (Costa et al. 2010). Estudos contínuos são necessários para investigar os mecanismos precisos que contribuem para essas anormalidades imunológicas verificadas na LV, embora se acredite que o parasito possa estar envolvido direta ou indiretamente neste processo.

Considerando as características acima descritas, 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 irão afetar de modo recíproco os pacientes coinfectados. Além disso, o fenômeno da intensa ativação do sistema imune aliada à resposta pró-inflamatória pode se apresentar potencializado na coinfeção, promovendo um agravamento da condição clínica dos pacientes.

Dessa maneira, a *Leishmania* pode influenciar a progressão para a AIDS ao contribuir para o aumento da ativação celular, que por sua vez, aumenta a suscetibilidade das células alvo à infecção, como também contribui para o aumento da replicação viral (Wolday et al. 1999). Esse aumento da carga viral pode ocorrer tanto nos indivíduos coinfectados, como em culturas *in vitro* (Cacopardo et al. 1996, Zhao et al. 2004). Um dos mecanismos propostos para o aumento da replicação viral é a presença de uma importante molécula presente na 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-KB (Bernier et al. 1998) e o consequente aumento da produção de TNF (Wolday et al. 1999), citocina previamente relacionada ao aumento da expressão de HIV-1 em células T e monócitos (Mellors et al.

1991). Mais recentemente, a presença de formas amastigotas de *L.infantum* promoveu o aumento da replicação do vírus em coculturas de células dendríticas humanas e linfócitos T CD4<sup>+</sup> autólogos. Tal resultado foi atribuído à secreção de fatores solúveis pelas células dendríticas, induzidos pelo parasito, entre eles a IL-6 e o TNF (Garg et al. 2009).

Estudos anteriores *in vivo* demonstraram que a citocina pró-inflamatória TNF está envolvida nos mecanismos de defesa contra a *Leishmania* (Barral-Neto et al. 1991 e Cenini et al. 1993), normalizando seus níveis após a terapia. Dessa maneira, um aumento na produção de TNF é esperado em indivíduos infectados pelo HIV-1 quando o sistema imune é ativado por doenças oportunistas, como a leishmaniose. Medrano e colaboradores (1998) verificaram que os pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV) apresentaram níveis aumentados de TNF quando comparados aos seus controles HIV positivos sem LV. Tais níveis permaneceram elevados mesmo após a recuperação e tratamento da LV e foram acompanhados por uma queda progressiva na contagem de células T CD4<sup>+</sup> e um aumento da viremia. Esses dados sugerem que a secreção de TNF pode resultar em importantes alterações virológicas e imunológicas nos pacientes coinfectados com a forma visceral da doença.

A LV também pode contribuir para a diminuição das contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em pacientes concomitantemente infectados pelo HIV-1 (Sinha et al. 2006). Recentemente, nosso grupo verificou baixas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em pacientes LV/HIV-1 durante a fase ativa da doença que assim permaneceram na fase de remissão clínica, apesar do tratamento para *Leishmania* e do uso de TARV (Alexandrino-de-Oliveira et al. 2010), sugerindo que de fato, a LV pode agravar a imunodeficiência de indivíduos infectados pelo HIV-1. A maior depleção de T CD4<sup>+</sup> nos pacientes LV/HIV-1 também pode ser consequência dos níveis mais altos de ativação do sistema imune nesses pacientes (Grossman et al. 2002).

Por outro lado, sabe-se que o controle ineficiente da replicação do parasito, em função da imunossupressão provocada pelo HIV-1 pode resultar em uma carga parasitária mais elevada, do que aquela observada em indivíduos sem HIV-1 (Antinori et al. 2007). Este fenômeno pode ser refletido pela explosão dos casos de reativação da LV, observada nas áreas de alta prevalência de infecção por *Leishmania* e HIV. Além disso, a continuada replicação parasitária na presença da terapia específica para *Leishmania* leva a um aumento da resistência ao tratamento (Alvar et al. 2008).

A infecção pelo HIV-1 também inibe a proliferação de linfócitos T e a produção de IFN- $\gamma$  frente aos antígenos de *Leishmania spp* (Da-Cruz et al. 1992, 2006), prejudicando a resposta imune celular e favorecendo a disseminação do parasito, que pode ser encontrado em localizações atípicas em indivíduos com HIV-1. Neste sentido, formas amastigotas têm sido recuperadas de outros órgãos fora do sistema fagocítico mononuclear, como nas glândulas adrenais, fluido cerebrospinal, laringe e até miocárdio (Alvar et al. 2008). Indivíduos coinfectados com baixas contagens de células T CD4<sup>+</sup> também já apresentaram formas amastigotas na pele, pulmões e tonsilas (Rosenthal et al. 2000), reforçando o conceito de que a expressão da leishmaniose está diretamente relacionada ao *status* imune do hospedeiro. Por fim, formas amastigotas também podem ser detectadas no trato gastrointestinal de pacientes apenas com LV (Muigai et al. 1983, Luz et al. 2010) devido às alterações nas vilosidades e criptas, ou mesmo pela oclusão da mucosa pelos parasitos ou crescimento bacteriano. Assim, o envolvimento intestinal em pacientes coinfectados é esperado (Balkhair et al. 2008, Gómez-Senent et al. 2009) e pode agravar a ativação imune local e a produção de citocinas inflamatórias. Outro importante indicativo do prejuízo da resposta imune celular à *Leishmania* é a negatividade do teste de Montenegro em pacientes HIV positivos (Alvar et al. 2008), sugerindo que células de memória também podem ser afetadas na coinfeção.

Estudos anteriores de nosso grupo (Da-Cruz et al. 2006) verificaram que pacientes coinfectados com HIV-1 e LTA apresentaram um percentual elevado de CD38<sup>+</sup> em T CD8<sup>+</sup>, bem como de HLA-DR em T CD3<sup>+</sup>, na fase ativa da leishmaniose, enquanto nos casos em remissão, estes níveis foram baixos. O acompanhamento prospectivo de pacientes coinfectados desde a fase ativa da doença até longos períodos após o tratamento é indispensável para se investigar se tais moléculas poderão ser utilizadas como parâmetros imunológicos para o prognóstico e grau de comprometimento imune dos pacientes com LV/HIV. Por fim, citocinas como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 também se encontram elevadas em indivíduos infectados pelo HIV-1 e podem não reduzir mesmo com o uso de TARV (Connolly et al. 2005), mantendo o estado geral de ativação, o que pode contribuir para agravar a resposta inflamatória em pacientes coinfectados com LV.

Embora, a introdução da TARV tenha modificado a história natural da infecção pelo HIV e suas infecções oportunistas relacionadas (Lawn et al. 2001), incluindo a LV (Tumbarello et al. 2000, Lopez-Velez et al. 2001, Del Giudice et al. 2002), ela não tem prevenido as reativações (Cota et al. 2011). Alguns pacientes com história de LV que

apresentaram uma boa resposta à TARV, reativaram a doença apesar da carga viral indetectável e parcial restauração da contagem de células T CD4<sup>+</sup> (Casado et al. 2001) o que pode indicar a persistência do parasito.

## **2.5 Exaustão do sistema imune como consequência da ativação celular – implicações para os pacientes de coinfeção *Leishmania*/HIV-1**

### **2.5.1 Imunosenesescência**

A deterioração da competência imune é parte de um processo natural do organismo que ocorre com o envelhecimento em decorrência dos sucessivos momentos de ativação do sistema imune ao longo da vida. Esse processo tem como resultado o declínio do sistema imune, que explica em parte, a morbidade e a mortalidade aumentada nesses indivíduos imunocompetentes. Por analogia, vem sendo considerado que o intenso grau de ativação imune na infecção pelo HIV-1 pode acelerar o envelhecimento do sistema imune, 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 imunosenesescência e pode se manifestar de maneira clonal e/ou global (Appay et al. 2007). Além disso, a imunosenesescência pode ser agravada na coinfeção com a LV, já que esta também cursa com um comprometimento sistêmico e ativação policlonal do sistema imune.

Atualmente o conceito de que a infecção pelo HIV-1 causa proliferação celular acelerada, expansão e morte de células T é bem aceito, e um dos principais fatores relacionados a esse intenso *turnover* de células T, inclusive de células específicas ao vírus é a persistente ativação do sistema imune (Grossman et al. 2006). Essa intensa proliferação celular gera inúmeros clones de células T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> terminalmente diferenciados, reconhecidos pelo fenótipo CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> (Papagno et al. 2004). Essas subpopulações tendem a perder a capacidade de secretar citocinas, como IL-2 e IFN- $\gamma$ , apresentam menor diversidade do repertório de células T (TCR) e maior suscetibilidade à morte induzida por ativação (Appay et al. 2007). Neste cenário, o indivíduo perde o controle da resposta imune ao vírus, que não é eliminado apesar da presença de células T CD8<sup>+</sup> específicas diferenciadas (Appay et al. 2002). Além disso, esses indivíduos infectados também passam a apresentar maior suscetibilidade a outras doenças infecciosas oportunistas, entre elas a

leishmaniose que pode, por sua vez, acelerar o processo de ativação celular e envelhecimento da população de células T.

Apesar da intensa proliferação observada mediante o processo de ativação celular, já foi previamente descrito que as células possuem um tempo de vida limitado, alcançando um estado de senescência replicativa que está diretamente relacionado ao número de divisões celulares. A senescência replicativa pode ser observada através da expressão da molécula CD57 na superfície das células T (Brenchley et al. 2003, Papagno et al. 2004, Focosi et al. 2010), perda da capacidade replicativa das células *in vitro* frente a mitógenos (Brenchley et al. 2003), bem como pelo encurtamento do telômero (Hodes et al. 2002). O comprimento do telômero é reduzido a cada divisão celular e esta redução pode causar uma instabilidade no cromossomo, de modo a causar uma parada na proliferação da célula e/ou sua apoptose (Hodes et al. 2002). A diminuição da atividade da telomerase, enzima envolvida na manutenção do comprimento do telômero, é diminuída com a estimulação do sistema imune, comprometendo a capacidade replicativa das células T específicas ao HIV-1 que alcançam a senescência (Plunkett et al. 2007). Neste cenário, células T CD8<sup>+</sup> específicas de indivíduos controladores da infecção pelo HIV-1 apresentaram comprimento do telômero longo e alta atividade da telomerase. Em contrapartida, telômeros curtos foram observados nas células dos chamados progressores típicos (Lichterfeld et al. 2008).

A ativação crônica do sistema imune ao lado de uma replicação viral persistente, mesmo que em níveis basais, leva à exaustão de certos clones, pela perda da capacidade replicativa, tornando-os senescentes. A exaustão clonal pode se apresentar ainda mais grave quando ocorre a perda irreversível de uma subpopulação de células específicas ao vírus que morre por apoptose induzida pela ativação (Brenchley et al. 2003). É importante destacar que a perda desses clones específicos para a resposta imune na infecção pelo HIV-1, capazes de reconhecer importantes epítopos virais, pode ajudar a explicar a perda do controle da replicação viral e o desencadeamento da AIDS (Appay et al. 2008). Além disso, dependendo da especificidade que é perdida pode ocorrer um comprometimento da resposta imune frente a outros patógenos.

A exaustão imune, entretanto, vai além da simples perda de alguns clones específicos para o HIV-1. Na verdade, o que se observa é um direcionamento da população de células T para um verdadeiro estado oligoclonal e senescente, com acúmulo de células

terminalmente diferenciadas, as quais não são repostas por um pool de células *naive* (Papagno et al. 2004).

A princípio, o sistema imune seria capaz de compensar essa perda de células T CD4<sup>+</sup> depletadas, bem como, substituir aquele *pool* celular altamente diferenciado, pelo aumento da produção de novas células pela medula óssea e, posterior maturação no timo; liberando para a periferia um repertório celular com novas e diferentes especificidades. Entretanto, os recursos primários são limitados e ocorre uma perda da capacidade de renovação dessa população de células pelo timo em indivíduos HIV-1 positivos (Douek et al. 2000). Assim, a diminuição das funções da medula óssea e do timo pode ser o resultado da exaustão dos recursos imunes primários, levando à alteração da homeostase imunológica, e caracterizando o processo de imunosenescência. Este processo culmina na quebra entre a resposta imune específica e a replicação viral basal, com súbito aumento da viremia, depleção das células T CD4<sup>+</sup> ainda existentes e colapso do sistema imune, que não possui mais a capacidade de controlar o aparecimento e/ou reaparecimento de qualquer outra patologia, caracterizando a AIDS.

Recentemente, a exaustão de células T CD8<sup>+</sup> específicas ao HIV-1 foi avaliada através da expressão elevada da molécula PD-1, (morte programada do inglês *death programmed*). PD-1 é um receptor inibitório da família CD28 expresso na superfície da membrana de linfócitos T, B, monócitos e células NKT após a ativação (Okazaki et al. 2005, Saresella et al. 2012). Estudos anteriores verificaram que a elevada expressão de PD-1 na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> nos indivíduos com infecção crônica pelo HIV-1 se correlacionava positivamente com a carga viral e negativamente com as contagens de células T CD4<sup>+</sup>, sugerindo uma relação entre a expressão de PD-1 e a progressão da doença (Day et al. 2006, Trautmann et al. 2006). Resultados similares foram verificados em indivíduos sob TARV, com diminuição da expressão de PD-1 após o início do tratamento e aumento repentino mediante o retorno da viremia pós-interrupção da terapia (Trautmann et al. 2006) . Em contrapartida, indivíduos não progressores apresentaram um percentual menor de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas positivas para PD-1 (Zhang et al. 2007).

Ainda não está totalmente esclarecido o mecanismo intrínseco nessa regulação negativa de PD-1 com seu ligante PD-L1 na função efetora de células T específicas, mas acredita-se que seja pelo prejuízo na secreção de citocinas (Day et al. 2006, Trautmann et al. 2006) e/ou pelo aumento da suscetibilidade à apoptose (Petrovas et al. 2009).

Consistente com esse pensamento, o bloqueio da via PD-1/PD-L1 resultou no aumento da capacidade proliferativa dessas células frente ao antígeno específico, na secreção de IFN- $\gamma$  e no aumento da atividade citotóxica, melhorando assim, a função efetora das células específicas (Day et al. 2006, Trautmann et al. 2006). Recentemente, o mecanismo responsável pela recuperação da capacidade proliferativa dos linfócitos T específicos após o bloqueio da via PD-1-PD-L1 foi elucidado e envolve o aumento da atividade da telomerase, com subsequente aumento do comprimento do telômero (Lichterfeld et al. 2008). Esses trabalhos mostraram que o prejuízo funcional é reversível e que um novo alvo terapêutico na infecção pelo HIV-1 poderia se basear na recuperação das células que sofreram exaustão clonal.

Interessantemente, alguns autores consideram que é importante destacar que essa diminuição reversível da função imune é completamente diferente daquela descrita anteriormente, em que ocorre a perda irreparável de certos clones específicos para o controle do HIV-1. Neste sentido, Sauce e colaboradores (2007) demonstraram que a expressão de PD-1 nas células T variava de acordo com o estágio de diferenciação e com o grau de ativação das células. Dessa maneira, uma interpretação mais cautelosa a respeito da expressão aumentada de PD-1 faz-se necessária, já que esta pode refletir uma exaustão celular ao lado do descontrole da replicação viral, mas também pode ser apenas o resultado da diferenciação de células T específicas, ativadas na presença da carga viral, independentes do processo de exaustão clonal. Consistente com este último fato, células positivas para PD-1 podem ser capazes de secretar citocinas e exibir perfis multifuncionais (Petrovas et al. 2006, Sauce et al. 2007). A expressão de PD-1 pode fazer parte de um mecanismo homeostático de controle da proliferação e de apoptose das células T já em estágios intermediários de diferenciação, enquanto que níveis baixos ou não expressão pode ser uma característica de células de memória central ou inicialmente diferenciadas (Petrovas et al. 2006). De qualquer maneira, esses estudos apontam que a expressão de PD-1 pode contribuir para alguns dos defeitos funcionais observados nas células T citotóxicas.

### **2.5.2 Prejuízo das funções tímicas e da diversidade de linfócitos T**

O timo é um órgão linfoide central sabidamente reconhecido por desempenhar um papel importante na patogenia da infecção pelo HIV-1 e, portanto, qualquer prejuízo na sua função leva a um desequilíbrio na geração de novas células T (Douek et al. 1998).



Várias razões já foram implicadas nesse processo de exaustão do *pool* de células *naive* da periferia, dentre elas, a infecção direta das células do estroma tímico e dos timócitos, involução tímica, similar a que ocorre com o avanço da idade, efeitos de citocinas pró-inflamatórias (TNF), ou mesmo a destruição da arquitetura do tecido linfóide tímico pelo aumento do processo fibrótico, resultante da ativação do sistema imune (revisto por Appay et al. 2008). A infecção de células-tronco hematopoiéticas também já foi relatada na infecção pelo HIV-1 (McCune. 2001).

Da mesma maneira que a infecção pelo HIV-1, a imunopatogênese da LV também é bastante complexa e compromete diferentes órgãos linfóides (Saha et al. 2006). Interessantemente, apesar do prejuízo da resposta imune efetora específica a antígenos de *L. infantum*, paradoxalmente ocorre em paralelo um processo de ativação policlonal crônico. Neste contexto, pacientes coinfectados, especialmente com a forma visceral da doença podem apresentar um efeito sinérgico sobre o comprometimento do sistema hematopoiético (Saha et al. 2006), e por sua vez, comprometerem a liberação de precursores de linfócitos T que completarão sua maturação no timo e constituirão novos clones na periferia.

As células T recentemente geradas e exportadas para a periferia são denominadas emigrantes tímicos recentes (ETC). A detecção e a quantificação desses emigrantes tímicos recentes fornecem uma medida acurada da função tímica ajudando a determinar se o timo está contribuindo para a repopulação de células *naive* em adultos e conseqüentemente para o repertório de células T periféricas (Douek et al. 1998, Ye et al, 2002). No entanto, a caracterização da função tímica humana é dificultada pela ausência de marcadores fenotípicos que identifiquem os ETC.

Neste contexto, Douek e colaboradores (1998) desenvolveram um ensaio capaz de estimar o chamado *output* tímico em amostras clínicas através da quantificação dos círculos de DNA episomais gerados durante o processo de rearranjo dos genes do receptor de células T (TCR), denominados círculos de excisão do rearranjo do TCR do inglês *TCR rearrangement excision circles* (TREC). Estes fragmentos de DNA são únicos de células T $\alpha\beta$  *naive*, são estáveis, não se duplicam durante a mitose das células, apresentando-se diluídos a cada divisão celular na periferia e vem sendo utilizados de forma bem sucedida na quantificação da função tímica em várias situações, tais como, involução do timo com a idade e em face de intervenções que levem a uma depleção de células T periféricas, como é o caso da infecção pelo HIV-1 (Douek et al. 2000, Ye et al. 2002).

A população de células T do sangue periférico é mantida em relativa homeostase por toda a vida do indivíduo devido à reposição tímica contínua e pela proliferação de células T já existentes na periferia. A concentração de TRECS em células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> de doadores saudáveis declina exponencialmente com a idade, mas a continuada presença de células TRECS<sup>+</sup> na periferia pode refletir a sustentada reposição tímica (Douek et al 1998, Zhang et al, 1999). Estes resultados verificaram que a involução tímica em consequência da idade afeta a timopoiese quantitativamente e não qualitativamente (Douek et al, 2000), o que demonstra que os timócitos adultos ainda passam por rearranjo gênico e que o timo retém a capacidade funcional de gerar novas células T para a periferia.

A involução tímica decorrente do envelhecimento pode agravar principalmente a reconstituição de células T durante a infecção pelo HIV-1 (Douek et al. 2000), quimioterapia, transplante de medula óssea (Castermans et al. 2011) e possivelmente em outras infecções que possam afetar a medula óssea, como é o caso da LV (Saha et al. 2006). É importante destacar que na coinfeção *Leishmania*/HIV-1, o efeito da involução tímica natural cursa ao lado das consequências do intenso processo de ativação do sistema imune sobre o timo. O comprometimento da função tímica prejudica a reconstituição imune, o fornecimento de um repertório diverso de células T capazes de responder a potenciais neoantígenos, bem como a recuperação de especificidades clonais perdidas pela depleção de células T e/ou pelo processo de exaustão imune (Bofill et al. 2006, Appay et al. 2008, Le et al. 2011).

Vários estudos vêm demonstrando que a infecção pelo HIV-1 causa diminuição nos níveis de TRECS em células T *naive* do sangue periférico de seres humanos e de macacos infectados com o SIV (Douek et al. 1998, Hatzakis et al. 2000, Sodora et al. 2002). Tal diminuição da função tímica geralmente está correlacionada a uma baixa recuperação dos níveis de células TCD4<sup>+</sup> e do controle da carga viral plasmática, contribuindo para uma progressão mais rápida para a AIDS (Hatzakis et al. 2000, Teixeira et al. 2001).

No entanto, a função da reposição tímica e sua inibição pelo HIV-1 vêm sendo questionada ao longo dos anos, uma vez que os níveis reduzidos de TRECS nas células T podem simplesmente refletir uma diluição secundária à proliferação aumentada de células T *naive* na periferia. Isso poderia ser decorrente da estimulação pelo vírus e do intenso processo de ativação do sistema imune (Hazenbergh et al. 2000). Outros fatores

relacionados incluem a taxa elevada de morte de células T periféricas e a redistribuição de células TREC<sup>+</sup> para o tecido linfoide durante a infecção pelo HIV-1 (Ye et al. 2002).

Estudos prévios verificaram que crianças e adultos infectados pelo HIV-1 com boa resposta à TARV, apresentam um aumento nos níveis de TRECS entre as células T *naive* (Douek et al. 1998, 2000, Chavan et al, 2001), sugerindo que o timo pode contribuir para a reconstituição imune pós-TARV. No entanto, é preciso considerar que tal aumento no conteúdo de TREC em células T *naive* também pode resultar da redução das altas taxas de proliferação e morte de células T, obtidas com a diminuição da ativação pelo uso de TARV (Hazenbergh et al. 2000).

De uma maneira geral, a diminuição dos níveis de TREC nas células T na periferia durante a infecção pelo HIV-1, bem como seu aumento pós-TARV devem ser atribuídos a múltiplos fatores, no qual uma combinação de eventos tímicos e periféricos pode contribuir para a perturbação na homeostase de células T, subjacente à patogênese da AIDS. No entanto, a manutenção e/ou retorno da atividade timopoiética em indivíduos infectados pelo HIV-1 sob TARV pode ajudar na recuperação da resposta proliferativa de células T aos antígenos e na normalização do repertório dessas células (Gorochov et al. 1998).

Neste cenário, pacientes concomitantemente infectados pelo HIV-1 e por *Leishmania*, especialmente àqueles coinfectados com a forma visceral da doença podem apresentar um prejuízo maior da função tímica, devido ao comprometimento da medula óssea, com deficiência de liberação de novos progenitores de linfócitos T para maturação no timo e elevados níveis de ativação linfocitária causada por ambas as infecções (Douek et al. 2009, Goto&Prianti. 2009). Recentemente, a observação de que pacientes coinfectados LV/HIV não recuperavam suas contagens de linfócitos TCD4<sup>+</sup> após o tratamento específico para *Leishmania*, e uso da TARV há pelo menos 12 meses (Alexandrino-Oliveira et al. 2010), pode sugerir o comprometimento timopoiético como um mecanismo contribuinte nesta deficiência.

### **2.5.3 Repertório de células T $\alpha\beta$**

O repertório de linfócitos T (TCR) é determinado pela diversidade genética e antigênica dos seus receptores para antígenos. O TCR é um heterodímero composto por uma cadeia alfa ( $\alpha$ ) e uma cadeia beta ( $\beta$ ), covalentemente ligada por uma ponte dissulfeto

(Meuer et al. 1983). Este heterodímero  $\alpha\beta$  é expresso em cerca de 90% dos linfócitos T, estando presente em ambas as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Cada uma dessas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam um domínio variável (V) e um domínio constante - C (Meuer et al. 1983). A justaposição das regiões variáveis (V) das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  forma o sítio de ligação e reconhecimento do complexo formado pelo peptídeo e o MHC.

Os receptores dos linfócitos T são gerados pela recombinação somática de diferentes segmentos gênicos durante a ontogenia, num processo chamado rearranjo V(D)J, no qual também são gerados os TRECS. A porção variável da cadeia  $\alpha$  é formada pelo rearranjo dos segmentos V (variável) e J (juncional), enquanto cadeia  $\beta$  é formada pelo rearranjo dos segmentos V, D (diversidade) e J (Mak et al. 1987). Existem cerca de 70-80 segmentos V $\alpha$  e 65 segmentos V $\beta$  e estes se encontram agrupados em famílias de acordo com o grau de identidade na sequência de nucleotídeos (Kimura et al. 1987, Rowen et al. 1996). Os linfócitos maduros que passaram pela seleção tímica irão migrar para os órgãos linfoides periféricos e constituirão o chamado repertório de células T. A avaliação do repertório de células T tem se baseado no estudo das cadeias  $\beta$ , mais especificamente nas famílias que constituem a porção variável da cadeia  $\beta$  (TCRV $\beta$ ).

Em relação à infecção pelo HIV-1, sabe-se que a expansão de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas específicas para o vírus coincide com o declínio da viremia e certo controle da replicação viral durante a fase aguda (Koup et al. 1994). Entretanto, ainda assim a doença progride, o que sugere que a resposta imune primária capaz de controlar a replicação viral pode não ser suficiente para promover um curso clínico favorável (Pantaleo et al. 1994). Dessa maneira, sugeriu-se que diferenças qualitativas estivessem envolvidas nessa resposta e de fato, uma análise do repertório TCRV $\beta$  nesses indivíduos infectados pelo HIV-1 na fase aguda indicou a existência de pelo menos três perfis diferentes de expressão das cadeias V $\beta$  do TCR: um perfil monoclonal, com a expressão dominante de apenas uma família V $\beta$ , um perfil oligoclonal, com a expansão de duas ou mais famílias V $\beta$  e um perfil policlonal, com a expansão de várias famílias V $\beta$  ou ainda a ausência de qualquer expansão. Pantaleo e colaboradores (1994 e 1997a) verificaram que a mobilização de um perfil mono-oligoclonal durante a fase aguda do HIV-1 está associada com um mau prognóstico e progressão mais rápida para a AIDS. Neste contexto, indivíduos não-progressores apresentam um repertório específico e efetivo que pode permanecer estável ou mais diverso ao longo da infecção (Pantaleo et al. 1997a).

Além disso, indivíduos infectados pelo HIV-1 podem exibir um número elevado de famílias V $\beta$  com distribuições diferentes entre os linfonodos e o sangue periférico, o que é compatível com o fato do tecido linfoide ser o principal sítio de replicação viral e, portanto, deste compartimento possuir linfócitos de várias especificidades antigênicas diferentes (Ramzazoui et al. 1995).

Estudos iniciais sobre o repertório TCRV $\beta$  na infecção pelo HIV-1 sugeriram que proteínas do HIV-1 poderiam atuar como superantígenos causando expansões e deleções de clones de células T carregando determinadas famílias de V $\beta$  (Hodara et al. 1993, Soudenys et al. 1993). Os superantígenos são proteínas virais ou bacterianas que possuem um modo único de se ligar tanto às moléculas do MHC como nos receptores de células, mais especialmente a certos domínios V $\beta$ . Tais superantígenos não necessitam do processamento peptídico para serem reconhecidos e são capazes de estimular uma grande quantidade de linfócitos T inespecificamente. Entretanto, essa hipótese inicial para a infecção pelo HIV-1 vem sendo substituída por estudos subsequentes que mostraram mudanças no uso das famílias V $\beta$ , com expansões e reduções de algumas delas, mas sem deleções de repertório, mesmo em indivíduos com doença avançada (Boldt-Houle et al. 1993, Cossarizza et al. 1995, Westby et al. 1998).

Uma vez que o perfil de distribuição do repertório de células T utilizado pode influenciar o prognóstico da doença é possível que a introdução da TARV resulte numa resposta imune menos restrita do que aquela encontrada antes do tratamento, melhorando a resposta imune específica, ajudando inclusive a controlar o aparecimento de infecções oportunistas. No entanto, os trabalhos descritos na literatura ainda são conflitantes no que se refere ao efeito da TARV sobre a dinâmica de normalização do repertório. Alguns estudos mostraram que a TARV promove a estabilização do repertório V $\beta$  durante a fase aguda do HIV-1, reduzindo o perfil oligoclonal verificado antes do tratamento (Soudeyns et al. 2000, Romiti et al. 2001). A análise da variação do comprimento da região de complementaridade 3 (CDR3) nos linfócitos T revelou alterações importantes dentro da população de células T CD4<sup>+</sup> *naive* em indivíduos infectados pelo HIV-1, que foram revertidas e normalizadas após a redução da carga viral e o aumento do *output* tímico obtidos pela TARV (Yin et al. 2009). Resultados similares foram observados em crianças infectadas pelo HIV-1, cuja carga viral elevada e as baixas contagens de células T CD4<sup>+</sup> se correlacionaram positivamente com as perturbações no repertório de células T CD8<sup>+</sup> *naive* (Kou et al. 2003).

Em contrapartida, Giovannetti e colaboradores (2003) mostraram a manutenção de um perfil oligoclonal no uso das famílias V $\beta$  em nove pacientes avaliados prospectivamente até três anos de TARV, sugerindo que o repertório não é completamente restaurado, mesmo diante da supressão da viremia plasmática e do aumento das contagens de células T CD4<sup>+</sup>. Um estudo prévio realizado por nosso grupo também evidenciou que pacientes HIV-1 brasileiros apresentaram um perfil de distribuição oligoclonal do repertório T após a TARV, mas com a mobilização de segmentos V $\beta$  diferentes daqueles utilizados pelos indivíduos infectados, antes do tratamento (Giacioia-Gripp et al. 2005).

Dessa maneira, o repertório de células T observado nos pacientes infectados pelo HIV-1 é consequência da patogênese do vírus, refletindo alterações quantitativas, mas também qualitativas, já que um desvio da resposta imune pode ser observado nesses casos. Além disso, os efeitos sobre a modulação do TCRV $\beta$  não podem ser dissociados dos efeitos causados pelas infecções oportunistas que aparecem nos estágios mais avançados da doença. Nesse contexto, a presença de LV e de uma resposta imune específica ao parasito poderia contribuir para alterar ainda mais o perfil de distribuição do repertório TCRV $\beta$ .

No que se refere à LV, não existe nenhuma informação na literatura sobre o perfil de distribuição do repertório de células T nos indivíduos acometidos. Os trabalhos descritos se referem a modelos experimentais com cepas dermatrópicas ou mesmo de pacientes com LTA. Neste sentido, camundongos infectados por *L.major* apresentaram a expansão da família V $\alpha$ 8V $\beta$ 4 dentro da população de células T CD4<sup>+</sup> (Reiner. 1993). Esta população foi implicada na produção inicial de IL-4 nos linfonodos desses camundongos após a interação com o antígeno LACK, do ingês, *Leishmania homologue of receptor for activated C kinase* (Launois et al. 1997).

Nos estudos em humanos, observou-se o aumento da expressão da família V $\beta$ 14 nas lesões de indivíduos infectados por *L.guyanensis* (Kariminia et al. 2007). De acordo com este último estudo, Clarêncio e colaboradores (2006) já tinham verificado uma diminuição da expressão de V $\beta$ 14 nas células T CD8<sup>+</sup> nos linfonodos de pacientes infectados por *L. braziliensis*, o que poderia refletir a migração dessas células para o sítio da infecção (Kariminia et al. 2007). De uma maneira geral, os estudos em LC tem mostrado a dominância de um perfil oligoclonal, similar ao que é visto na infecção pelo HIV-1, com um número limitado de famílias V $\beta$  sendo expressos nas lesões (Ueymura et al. 1993). Além disso, os pesquisadores já observaram que os linfócitos T das lesões dos

pacientes apresentavam um perfil de TCR diferente daquele visto no sangue periférico. Recentemente, as células do linfonodo de pacientes com LC ativa foram cultivadas *in vitro* na presença do antígeno de *Leishmania* e avaliadas para o uso do seu TCR. O repertório de células T específicas implicou na expansão de algumas famílias simultaneamente à diminuição de outras, sugerindo a presença de mecanismos de proliferação e expansão clonal frente ao antígeno, bem como a possibilidade de apoptose após a estimulação (Clarêncio et al. 2006). Além disso, a família V $\beta$ 12 se destacou entre os clones de linfócitos T presentes no linfonodo, após a vacinação dos indivíduos e nas respostas *in vitro* frente ao antígeno específico, apontando tal família na resposta imune para a *Leishmania*. As famílias V $\beta$ 9, V $\beta$ 13.2 e V $\beta$ 23 parecem ser preferencialmente expandidas em pacientes com LTA clinicamente curados (Ferraz. 2010).

Considerando os dados acima descritos ao lado do fato das células T estarem envolvidas na patogênese da LV e do HIV-1 e que o sistema imune encontra-se comprometido nas duas infecções, torna-se importante investigar qual é o perfil de distribuição do repertório do TCR nos pacientes coinfectados. Este estudo poderá nos informar o quão esse perfil difere ou não daqueles indivíduos acometidos por apenas umas das enfermidades, bem como quais famílias V $\beta$  sofrem expansão e/ou restrição mediante uma situação de coinfeção LV/HIV-1. Além disso, a análise do repertório dos linfócitos capazes de reconhecer antígenos específicos de *Leishmania* após a reconstituição imune deve ser de grande importância para se compreender a capacidade desses indivíduos manterem os parasitos sob controle durante a remissão da leishmaniose. O estudo do repertório específico que é mobilizado frente aos antígenos de *Leishmania* ou HIV-1 também ajudará a entender de que maneira a intensa ativação celular e a consequente exaustão imune influenciam a resposta imune específica.

### 3. RACIONAL

A coinfeção *Leishmania*/HIV é uma doença emergente em várias regiões do mundo e a evolução do agravo é profundamente dependente da resposta imune celular. A desregulação do sistema imunológico provocada pelo HIV compromete os mecanismos de controle da *Leishmania*, assim como, componentes do parasito podem aumentar a replicação do HIV, acelerando a evolução para a Aids.

A ativação imune crônica é uma das principais características da infecção pelo HIV-1 e a utilização de moléculas associadas à ativação celular é considerada um importante parâmetro imunológico para a avaliação do prognóstico e do grau de comprometimento imune dos pacientes HIV positivos. Ao mesmo tempo, na LV também ocorre um processo de ativação policlonal crônico, o que pode se constituir um fator adicional para a ativação celular em pacientes concomitantemente infectados pelo HIV-1. Assim, distúrbios imunológicos causados por ambas as enfermidades irão afetar de modo recíproco os pacientes coinfectados. Recentemente, altos níveis de ativação linfocitária foram observados na fase ativa da leishmaniose tegumentar (LT) em pacientes coinfectados LTA/HIV, enquanto na fase de remissão estes foram baixos (Da-Cruz et al. 2006) sugerindo que as moléculas CD38 e HLA-DR poderiam ser preditoras da evolução da doença e que o acompanhamento individual por longo prazo dos pacientes coinfectados pode auxiliar no estabelecimento de parâmetros imunológicos preditores do controle ou do risco de reativação, além de medidas terapêuticas que melhorem a qualidade de vida desses pacientes.

A intensa ativação do sistema imune pode acentuar o comprometimento da função efetora nestes pacientes coinfectados LV/HIV-1 favorecendo a replicação parasitária, o que explicaria as frequentes reativações da doença. Além disso, estudos anteriores já mostraram que a resposta imune celular ao parasito está comprometida na coinfeção *Leishmania*/HIV, o que poderia contribuir para o aparecimento de quadros clínicos atípicos de disseminação da doença, com visceralizações por espécies dermatrópicas de *Leishmania* ou manifestações cutâneas por espécies viscerotrópicas.

Vários mecanismos podem contribuir para a ativação do sistema imune na infecção pelo HIV-1 e na infecção por *L. infantum* sejam eles direto ou indiretamente relacionados ao patógeno. A depleção de células T CD4<sup>+</sup> do trato gastrointestinal durante a infecção aguda pelo HIV-1 com conseqüente dano à barreira mucosa permite a



translocação de produtos microbianos para a circulação e já foi associada à ativação crônica do sistema imune em indivíduos infectados. A LV também cursa com uma profunda imunossupressão e com parasitismo intestinal, o que poderia comprometer a barreira mucosa e favorecer a passagem de produtos microbianos. Tais produtos poderiam contribuir para o ambiente ativado e inflamatório observado nos pacientes de LV. Além disso, esse fenômeno poderia ser potencializado em indivíduos concomitantemente infectados por ambos patógenos.

Recentemente, essa ativação também vem sendo associada ao alto *turnover* de células T, com subsequente aumento de células terminalmente diferenciadas e diminuição do *output* tímico pela exaustão dos recursos imunes primários, semelhante ao que ocorre em indivíduos idosos saudáveis. Dessa maneira, o estudo da perda da capacidade replicativa dessas células, associada ao comprometimento do perfil de distribuição do repertório de linfócitos T podem contribuir para o entendimento dos efeitos da interação entre esses patógenos na evolução da LV e do HIV/Aids. Por fim, o perfil de distribuição do repertório de linfócitos T frente aos antígenos de *Leishmania* e do HIV-1 será de fundamental importância para apontar possíveis direcionamentos da resposta relacionados à reconstituição imunológica deficiente, ao controle do parasito ou às frequentes reativações da doença.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

Avaliar a influência da infecção por *Leishmania* no grau de comprometimento imune e na ativação do sistema imune de indivíduos concomitantemente infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida tipo 1 (HIV-1), bem como avaliar o impacto da reconstituição imune pós-terapia antiretroviral e tratamento anti-*Leishmania* na recuperação da resposta imune celular e na evolução da leishmaniose visceral americana (LV).

### 4.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar se a leishmaniose (LV e LT) pode influenciar o grau de comprometimento imune de pacientes coinfectados com HIV-1, através da contagem de células T CD4<sup>+</sup> e das características fenotípicas de linfócitos T de sangue periférico quanto à expressão de moléculas relacionadas à ativação celular (CD38 em T CD8<sup>+</sup>), para definir se estas podem se constituir em marcadores imunológicos preditores de reativação da doença, assim como, de prognóstico de evolução favorável.
- ✓ Investigar a ocorrência do fenômeno da translocação microbiana em indivíduos apenas infectados por *L. infantum*, assim como, sua possível associação com as funções linfocitárias efetoras, com vistas a investigar a presença de um mecanismo alternativo capaz de influenciar a ativação celular na LV.
- ✓ Avaliar fatores microbianos potencialmente associados à ativação celular através da quantificação do parasitismo por *Leishmania* e de produtos da translocação microbiana, no intuito de entender as causas da manutenção do *status* imune ativado de indivíduos coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1), apesar da terapia anti-*Leishmania* e do uso de antiretrovirais.
- ✓ Avaliar o perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias na coinfecção *Leishmania*/HIV, com vistas a definir como se dá a modulação das mesmas, mediante o intenso grau de comprometimento e ativação do sistema imune.
- ✓ Avaliar se o fenômeno de imunosenescência ocorre na coinfecção *Leishmania*/HIV e qual o seu impacto no curso clínico do agravo.
- ✓ Avaliar o repertório de linfócitos T *ex vivo* e *in vitro* pós-estímulo com antígenos do parasito e/ou do vírus, através da caracterização das regiões variáveis da cadeia beta (V $\beta$ ) do receptor, em pacientes coinfectados com LV e HIV-1, bem como verificar se a terapia antiretroviral, aliada ao tratamento anti-*Leishmania* alteram o perfil de expressão das famílias V $\beta$  nesses pacientes.

## **Capítulo 2**

## 5. MÉTODOS E RESULTADOS

### Artigo 1 (Publicado)

**Título:** “High levels of T lymphocyte activation in *Leishmania*-HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load”

**Autores:** Joanna R. Santos-Oliveira, Carmem B.W. Giacoia-Gripp, Priscilla Alexandrino de Oliveira, Valdir S. Amato, Jose Ângelo L. Lindoso, Hiro Goto, Manoel P. Oliveira-Neto, Marise S. Mattos, Beatriz Grinsztejn, Mariza G. Morgado, Alda M. Da-Cruz.

BMC Infectious Diseases 2010; 10: 358-363.

### RESUMO

**Introdução:** Infecções concomitantes podem influenciar a progressão do HIV por causar uma ativação crônica levando ao declínio da função de células T. Nas Américas, a leishmaniose visceral (LVA) e a leishmaniose tegumentar (LTA) emergiram como infecções oportunistas importantes nos pacientes de HIV-AIDS e ambas tem sido implicadas como cofatores potencialmente importantes na progressão da doença. Nós investigamos se a leishmaniose aumenta a ativação linfocitária nos pacientes co-infectados com HIV-1. Isso poderia contribuir para prejudicar a função imune celular.

**Métodos:** Para abordar essa questão, nós analisamos as contagens absolutas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e a proporção de células T CD8<sup>+</sup> expressando a molécula CD38 em pacientes coinfetados *Leishmania*/HIV que se recuperaram após a terapia antileishmanicida.

**Resultados:** Nós encontramos que, apesar da remissão clínica dos pacientes de leishmaniose, os pacientes coinfetados de LVA apresentaram uma imunossupressão mais grave, como sugerido pelas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup>, diferindo dos casos de LTA/HIV-AIDS que tendem a apresentar níveis mais elevados (acima de 350 células/mm<sup>3</sup>). Além disso, cinco dos nove pacientes de LVA/HIV-AIDS apresentaram baixas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> apesar da carga viral baixa ou indetectável. A expressão de CD38 sobre os linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi significativamente mais alta nos casos de LVA ou LTA/HIV-AIDS comparada aos pacientes de HIV-AIDS sem leishmaniose ou indivíduos saudáveis.

**Conclusões:** A infecção por *Leishmania* pode aumentar o grau de ativação do sistema imune em indivíduos concomitantemente infectados com HIV. Em adição, pacientes LVA/HIV-AIDS podem apresentar baixas contagens de células T CD4<sup>+</sup> e maiores proporções de linfócitos T ativados, mesmo quando a carga viral está indetectável pelo controle da terapia antiretroviral (HAART). Este fato pode causar uma má interpretação desses marcadores laboratoriais nos pacientes coinfetados.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# High levels of T lymphocyte activation in *Leishmania*-HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load

Joanna R Santos-Oliveira<sup>1</sup>, Carmem BW Giacoia-Gripp<sup>2</sup>, Priscilla Alexandrino de Oliveira<sup>3</sup>, Valdir S Amato<sup>4</sup>, Jose Ângelo L Lindoso<sup>5</sup>, Hiro Goto<sup>5</sup>, Manoel P Oliveira-Neto<sup>6</sup>, Marise S Mattos<sup>6</sup>, Beatriz Grinsztejn<sup>6</sup>, Mariza G Morgado<sup>2</sup>, Alda M Da-Cruz<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Concomitant infections may influence HIV progression by causing chronic activation leading to decline in T-cell function. In the Americas, visceral (AVL) and tegumentary leishmaniasis (ATL) have emerged as important opportunistic infections in HIV-AIDS patients and both of those diseases have been implicated as potentially important co-factors in disease progression. We investigated whether leishmaniasis increases lymphocyte activation in HIV-1 co-infected patients. This might contribute to impaired cellular immune function.

**Methods:** To address this issue we analyzed CD4<sup>+</sup> T absolute counts and the proportion of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD38 in *Leishmania*/HIV co-infected patients that recovered after anti-leishmanial therapy.

**Results:** We found that, despite clinical remission of leishmaniasis, AVL co-infected patients presented a more severe immunosuppression as suggested by CD4<sup>+</sup> T cell counts under 200 cells/mm<sup>3</sup>, differing from ATL/HIV-AIDS cases that tends to show higher lymphocytes levels (over 350 cells/mm<sup>3</sup>). Furthermore, five out of nine, AVL/HIV-AIDS presented low CD4<sup>+</sup> T cell counts in spite of low or undetectable viral load. Expression of CD38 on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was significantly higher in AVL or ATL/HIV-AIDS cases compared to HIV/AIDS patients without leishmaniasis or healthy subjects.

**Conclusions:** *Leishmania* infection can increase the degree of immune system activation in individuals concomitantly infected with HIV. In addition, AVL/HIV-AIDS patients can present low CD4<sup>+</sup> T cell counts and higher proportion of activated T lymphocytes even when HIV viral load is suppressed under HAART. This fact can cause a misinterpretation of these laboratorial markers in co-infected patients.

## Background

*Leishmania*/HIV-1 co-infection has been considered an emerging disease mainly due to the expansion of the AIDS epidemic over leishmaniasis endemic areas and vice-versa [1]. Visceral leishmaniasis associated-HIV/AIDS is well known as an opportunistic disease especially in the Mediterranean basin [1]. However, an increasing number of reports of tegumentary leishmaniasis-HIV/AIDS patients underlines the importance of this additional association [2-6]. In America, vector

sandflies and *Leishmania* species that cause American visceral leishmaniasis (AVL) and tegumentary leishmaniasis (ATL) differ from those observed in other endemic regions around the world. This could result in the particular clinical features observed in HIV-co-infected patients in the New World [3,7]. In Brazil, both *Leishmania* and HIV infection are endemic and this co-infection is becoming an important public health problem [1,7].

The clinical outcome of both AVL and ATL is dependent on the *Leishmania*-specific immune response. This influence can be exerted in many different ways. AVL is a systemic infection affecting lymphoid organs; it is associated with parasite antigens driving an impaired

\* Correspondence: alda@ioc.fiocruz.br

<sup>1</sup>Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, CEP 21040-360, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

T-cell response leading to a depletion of bone marrow as well as systemic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Profound immunosuppression is the consequence [8-11]. In contrast, ATL is a benign disease which affects skin and mucous membranes. In these ATL patients, the specific immune response is preserved though not well regulated, leading to tissue damage [10,12]. Even considering the differences in the clinical and immunopathogenesis of those AVL and ATL, T lymphocyte function is affected in both diseases, and the clinical cure is achieved by restoration of an adequate effector immune response [9-12].

Earlier studies have shown that *Leishmania* infection can promote HIV-1 replication *in vitro* [13] and *in vivo* [14]. Beside this, HIV-1 infection impairs macrophage ability to control intracellular protozoans, enabling *Leishmania* growth [15,16]. While highly effective antiretroviral therapy (HAART) has been shown to decrease significantly the incidence of leishmaniasis in HIV-infected patients [17,18], it does not seem to prevent relapses [19]. This suggests that maintenance of the parasite can impact the pathogenesis of both diseases.

Low lymphocyte recall responses after parasite stimulation but preserved IFN- $\gamma$  production in ATL-HIV-AIDS patients were already demonstrated [3]. On the other hand, high type 2 cytokines levels are observed in HIV/AIDS associated AVL, potentially favoring the dissemination of both the virus and *Leishmania* [14]. Moreover, increased levels of CCR5 molecules on CD3<sup>+</sup> lymphocytes were also observed in AVL/HIV-AIDS [20], suggesting that *Leishmania* infection could favor HIV-1 entry into its target cells through this receptor. Immunological studies reporting *Leishmania*/HIV co-infection generally involve patients with active disease [3,14,20,21], but the mechanisms that maintain leishmaniasis in remission, and by consequence the factors that predispose the parasite reactivation are poorly understood.

Chronic activation of the immune system has been considered an important mechanism related to declining lymphocytic functions and has become an important tool for monitoring HIV-1 infected patients [22]. The proportion of CD8<sup>+</sup> T cells that express CD38<sup>+</sup>, a surrogate of activation marker, can predict the subsequent decline of the CD4<sup>+</sup> T cell population [23] and was correlated with high viral load levels in HIV infected individuals [24]. Actually, the degree of cellular activation, evidenced by the co-expression of CD38 and HLA-DR on T lymphocytes has been considered an important predictor of disease progression [25]. Concomitant infections can exert an impact on viral replication by contributing to an increase in T lymphocyte activation already seen in HIV patients [26]. In accordance with this, co-infection with HIV and tuberculosis results in high levels of CD38 on CD8<sup>+</sup> T cells [27]. Nevertheless,

viral infections concomitant with HIV-1 infection seem to have different effects on T lymphocyte activation. Recent evidence showed that Hepatitis C virus/HIV-1 co-infected patients presented elevated immune activation levels, despite effective antiretroviral therapy [28]. On the other hand, GB virus type C replication has been associated to lower T cell activation, which has considered a protective mechanism involved in the HIV-1 disease progression [29]. No influence of human herpesvirus replication on cell activation has been observed [30]. However, the impact of *Leishmania* infection on T cell perturbation due to HIV-1 is still unclear." We hypothesized that *Leishmania* infection could be an additional factor for lymphocyte activation and lead to impaired effect or immune function, favoring parasite replication and, consequently, frequent relapses. Therefore, we investigated whether leishmaniasis could impact T lymphocytes activation in HIV-1 co-infected patients through the analysis of CD4<sup>+</sup> T absolute counts and of the proportion of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD38 in *Leishmania*/HIV co-infected patients recovered after anti-leishmanial therapy.

## Methods

### Patients and Subjects

Seventeen HIV-*Leishmania* co-infected patients (AVL-HIV/AIDS - 9 cases and ATL-HIV/AIDS - 8 cases) were enrolled for this study. Patients were in the remission phase, minimum six months after the end of their anti-*Leishmania* treatment and had no signs or symptoms of active leishmaniasis (Table 1). Sixteen HIV-1/AIDS cases, without previous leishmaniasis paired with co-infected patients by viral load (HIV RNA copies/mL: < 400, > 400 to 10.000 and over > 10,000 copies/mL) and eight healthy volunteers were included as controls. HIV/AIDS patients were receiving antiretroviral therapy for at least one year, according to the Brazilian guidelines. Informed consent was obtained from all participants. The study was approved by the Fundação Oswaldo Cruz and IPEC Ethical Committees.

### Immunologic and virologic assessments

To determinate the absolute counts of CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, a BD Tritest<sup>®</sup> monoclonal antibody specific for CD4/CD8/CD3 conjugated to FITC, PE and PerCP, respectively and BDTrue Count<sup>®</sup> reagent kit was used according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Samples were acquired using a FACSCalibur<sup>®</sup> (BD, USA) and analysed by Multiset<sup>®</sup> software (BD, USA). Plasma HIV-1 RNA levels were quantified using the branched DNA assays (Siemens, Versant HIV-1 RNA 3.0, Tarrytown, NY, USA). The lower limit of detection for this assay was 50 copies/mL.



**Table 1 Clinical and laboratorial characteristics of HIV-1 co-infected leishmaniasis patients and control groups**

Parameters	AVL/HIV-1 patients (n = 9)	ATL/HIV-1 patients (n = 8)	HIV-1 infected* (n = 16)	Healthy subjects (n = 8)
Age, years, (median)	38 (35-50) <sup>a</sup>	44 (38-54) <sup>b</sup>	39 (33-49) <sup>c</sup>	26 (25-30) <sup>abc</sup>
Male sex, n, (%)	9 (100) <sup>d</sup>	8 (100) <sup>e</sup>	15 (94) <sup>f</sup>	4 (50) <sup>def</sup>
CD4 <sup>+</sup> T Cell count, cells/mm <sup>3</sup>	62 (52-127) <sup>g</sup>	404 (294-597) <sup>h</sup>	380 (223-450) <sup>i</sup>	1,106 (957-1,300) <sup>ghi</sup>
Current AIDS diagnosis, Number of cases (%)	9 (100)	6 (75)	8 (50)	---
Time of clinical remission of leishmaniasis, months	8 (6-12)	11 (7.5-14)	---	---
Patients with undetectable viremia, (%)	5 (55.6)	4 (50)	9 (56.2)	---
Viral load levels of patients with detectable viremia, copies/mL	142,240 (24,025-279,321)	6,200 (2,012-78,176)	12,010 (2,000-136,625)	---

N = number, AVL - American visceral leishmaniasis, ATL - American tegumentary leishmaniasis \*HIV-1 infected patients without leishmaniasis Note: Data are median (interquartile range) values, except for current AIDS diagnosis.

Patients × Health subjects (a - p < 0.001; b/c - p < 0.01; d/e/f × g/h/i - p < 0.05), g/h/i × ghi - p < 0.001; g × h - p < 0.01; g × i - p < 0.01.

#### Obtainment of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and immune activation

PBMC were separated by centrifugation over a gradient of Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% of sodium azide (Sigma, USA). PBMCs were adjusted to 10<sup>5</sup> cells and labeled with anti-CD8 FITC plus anti-CD38 PE monoclonal antibodies (BD Simultest™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After incubation, the cells were fixed with PBS plus 1% paraformaldehyde. At least 10,000 events were acquired using a FACSCalibur and phenotypic analysis was carried out by using CellQuest™ software (BD). Although the validated marker of CD8<sup>+</sup>T cell activation is the co-expression of CD38 and HLA DR, we used the detection of CD38 in CD8<sup>+</sup> as a surrogate of this validated marker [25]. CD38 positivity was determined on CD8<sup>+</sup> T cell populations inside the gate previously established for TCD3<sup>+</sup> and expressed as a percentage of CD38 in CD8<sup>high</sup>.

#### Statistical analysis

The values were expressed as medians and interquartile range. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test (GraphPad Prism, version 4.0, San Diego, CA, USA). Multivariate linear regression analysis (SPSS software, version 9.0) was used to determine influence that of interventional factors on the percentage of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD38 (dependent variable). Absolute counts of CD4<sup>+</sup> T cells, viral load (undetectable or detectable) and *Leishmania* infection (presence or absence) were considered as independent variables. Statistically significant differences were considered when p < 0.05.

#### Results

Clinical and laboratory characteristics are depicted in Table 1 and 2. AVL-HIV/AIDS patients in clinical

remission showed significantly (p < 0.001) lower numbers of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in comparison to HIV-1 infected patients without leishmaniasis, (Figure 1A and Table 1). In contrast, CD4<sup>+</sup> T counts in ATL-HIV/AIDS patients were similar to HIV-1 infected patients without leishmaniasis (Figure 1A). Both types of co-infected patients and the HIV-1 infected patients without leishmaniasis had much lower levels of CD4<sup>+</sup> T counts when compared to healthy donors (p < 0.001, Figure 1A).

HIV-1 viral load in AVL/HIV-AIDS was not correlated with CD4<sup>+</sup> T cell count, since low or undetectable levels of HIV-1 were seen even in patients with very low CD4<sup>+</sup> T cells counts (Figure 1B). By contrast, ATL/HIV-AIDS patients in clinical remission had higher CD4<sup>+</sup> T cell numbers and exhibited the lowest HIV plasma viral load (Figure 1B).

HIV-1 co-infected individuals (AVL and ATL), had a significantly higher percentage of CD8<sup>+</sup> T cells that expressed CD38 when compared to HIV-1 infected patients without leishmaniasis (median 55.8%; [49% - 64%], p < 0.05) (Figure 1C). However, the frequency of CD38 expressed by the CD8<sup>+</sup> T cell subset was much higher in AVL/HIV-AIDS cases (median 93.5%, [87%-97.9%]) than in patients with ATL/HIV-AIDS (median 77%, [69%-83.6%], p < 0.001). Healthy blood donors showed the lowest levels of CD8<sup>+</sup> T cell activation (CD38<sup>+</sup> on CD8<sup>+</sup> T cells = median 31.2%; [24%-35.6%], p < 0.001) (Figure 1C). There was no correlation between the percentages of CD38 on CD8<sup>+</sup> T cell and plasma HIV-1 viral load (Table 3), since high levels of activation were observed despite viral load levels in the co-infected patients (Figure 1D). HIV-1 infected controls presented a positive correlation between the viral load and cellular activation (p = 0.01, r = 0.60, data not show).

A multivariate statistical analysis showed a significant positive correlation between *Leishmania* infection and the levels of CD38 on CD38 T lymphocytes (p < 0.001),

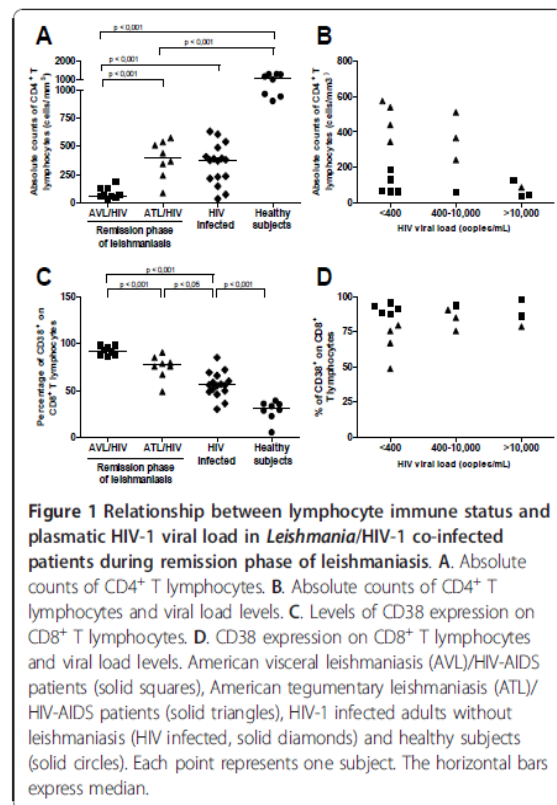
**Table 2 CD4+ T cell counts and viral load levels of HIV-AIDS associated leishmaniasis patients (visceral or tegumentary) and HIV-1 infected control group**

Patient's Number	CD4+ T cells counts(cells/mm <sup>3</sup> )	Viral load levels (copies/mL)
<b>VL/HIV-AIDS</b>		
1	78	< 400
2	59	5,810
3	33	316,402
4	129	< 400
5	61	< 400
6	45	242,240
7	187	< 400
8	124	42,240
9	68	< 400
<b>TL/HIV-AIDS</b>		
1	367	1,700
2	440	< 400
3	512	2,324
4	86	146,351
5	541	< 400
6	345	< 400
7	576	< 400
8	242	10,000
<b>HIV-1 infected</b>		
1	146	136,625
2	543	< 400
3	215	< 400
4	34	12,010
5	230	253,761
6	609	< 400
7	391	< 400
8	491	< 400
9	377	< 400
10	73	1,750
11	371	10,000
12	236	< 400
13	635	< 400
14	382	2,000
15	394	55,239
16	410	< 400

independently of CD4+ T counts and HIV viremia (Table 3). A covariance was not performed because of the low number of ATL and AVL patients.

**Discussion**

*Leishmania* can persist in the host after treatment and may further reactivate under immunosuppression [1]. A host parasite dynamic equilibrium does not seem to be reached in HIV co-infected patients probably because immunosuppressed patients are not able to mount an efficient T-cell response to control *Leishmania*, resulting



**Figure 1 Relationship between lymphocyte immune status and plasmatic HIV-1 viral load in *Leishmania*/HIV-1 co-infected patients during remission phase of leishmaniasis. A.** Absolute counts of CD4+ T lymphocytes. **B.** Absolute counts of CD4+ T lymphocytes and viral load levels. **C.** Levels of CD38 expression on CD8+ T lymphocytes. **D.** CD38 expression on CD8+ T lymphocytes and viral load levels. American visceral leishmaniasis (AVL)/HIV-AIDS patients (solid squares), American tegumentary leishmaniasis (ATL)/HIV-AIDS patients (solid triangles), HIV-1 infected adults without leishmaniasis (HIV infected, solid diamonds) and healthy subjects (solid circles). Each point represents one subject. The horizontal bars express median.

in frequent relapses especially in AVL but also in ATL [1,5]. We found that despite clinical remission of protozoan disease, AVL co-infected patients were more severely immunosuppressed than ATL co-infected patients. Furthermore, lymphocyte activation status was higher in both groups of co-infected patients than in HIV-1-infected patients without leishmaniasis. Our results suggest that *Leishmania* infection increases the degree of the immune system activation in individuals concomitantly infected with HIV-1. This phenomena

**Table 3 Multivariate linear regression analysis to evaluate the association between T cell activation (CD38+ on CD8+ T lymphocytes) and independent variables in leishmaniasis and HIV-1 co-infected patients**

Independent variables	Dependent variable		
	Percentage of CD38+ on CD8+ T lymphocytes		
	Coef <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup>	P
<i>Leishmania</i> infection (presence or absence)	24.88	4.63	0.000011
CD4+ T cell count, cells/mm <sup>3</sup>	-0.02	0.013	0.13
Viral load levels (detectable or undetectable)	4.12	4.85	0.39

1 Coef - Correlation coefficient, 2 SE - Standard error  
 Obs. HIV-1 infected patients were also included in this analysis.



can affect immune effector function and may constitute an additional mechanism for explain relapses.

Both AVL and ATL tend to emerge as opportunistic diseases in HIV infected patients without leishmaniasis especially in those presenting with CD4<sup>+</sup> T cell levels below 350 cells/mm<sup>3</sup> [1,4,5,31,32]. In this study, AVL/HIV-AIDS patients presented very low CD4<sup>+</sup> T cell levels during remission of clinical symptoms after successful anti-leishmanial therapy and under HAART use. This was not observed in ATL/HIV-AIDS. The low CD4<sup>+</sup> T cell counts observed in AVL co-infected patients cannot be solely explained by lymphocyte depletion related to HIV-1 replication, since low CD4<sup>+</sup> T cell counts were observed in AVL/HIV-AIDS patients with undetectable or low viral load levels. Additionally, CD4 T cell depletion of bone marrow caused by both HIV infection [33] and AVL [9,11] was already demonstrated and may lead to deficiencies in the input of new lymphocytes into the periphery. These factors could explain why AVL/HIV-AIDS patients already had CD4 cell counts lower than 200 cells/mm<sup>3</sup> at the beginning of anti-leishmanial therapy (data not shown), which additionally could contribute to the maintenance of low levels during remission phase. By contrast, the immunopathogenesis of ATL/HIV-AIDS may not be related to systemic immunosuppression since ATL is more restricted to the tegument and the draining lymph nodes. In this connection, these ATL/HIV-AIDS patients in remission phase apparently recovered their lymphocyte levels (data not shown) since they have much higher CD4<sup>+</sup> T cell counts than those previously observed in patients with active disease [3-5].

In the present study we have shown that leishmaniasis/HIV-AIDS patients displayed elevated levels of CD38 on CD8<sup>+</sup> T cells levels in relation to HIV-1 infected patients without leishmaniasis. This implies that concomitant *Leishmania* infection could contribute to enhance the activation induced by HIV antigens as has been described in tuberculosis [27] and hepatitis C virus [28]. The finding of high CD38 levels positively correlated with *Leishmania* infection reinforces the idea that leishmaniasis can be a cofactor to of this heightened activation status. It is known that high activation levels are inversely proportional to the CD4<sup>+</sup> T cell levels, suggesting that activation could also contribute to the T cell depletion [22,25,34]. Interestingly, CD38 levels observed in co-infected patients were much higher than those seen in cured AVL and ATL patients without HIV/AIDS (unpublished data). This result raises the possibility that parasite persistence might have a role in this activation process, since released *Leishmania* antigens can stimulate lymphocytes. The frequent relapses described in AVL/HIV-AIDS, which occur more frequently than in ATL/HIV-AIDS patients, could be evidence of this reduced ability to maintain the parasite under control due to the impaired immune function [4,19]. Viscerotropic

*Leishmania* species in the bone marrow promote immunological damage to a greater extent than dermatropic parasites do in the skin [4,11].

This could be, at least in part, why activation levels were higher in AVL/HIV-AIDS than in ATL/HIV-AIDS patients.

## Conclusion

Taken together, our results point to co-infection with leishmaniasis as a factor that is likely to increase the severity of immunodeficiency caused by HIV, especially in AVL/HIV-AIDS patients. The low T CD4 cell counts among those patients with AVL/HIV-AIDS after remission, even in the absence of detectable viral load may have important implications for the HAART monitoring. Furthermore, the prognostic value of CD38 expression on CD8<sup>+</sup> T cells might not be useful in predicting HIV-1 progression in co-infected patients [35] since these molecules levels stay elevated after clinical remission of leishmaniasis. To our knowledge no previous study has evaluated the degree of immune activation in *Leishmania*/HIV-1 co-infected patients. Further studies evaluating the consequences of high levels of cellular activation will be of great interest as immunological abnormalities in T lymphocyte function can impact the clinical course of both infections.

## Acknowledgements

We are very grateful to Dr. David Watkins for helpful discussions and for critical reviewing of this manuscript. To thanks Dr. Alvaro Bertho to assistance with flow cytometric analysis and helpful advices, to Dr. José Henrique Pilotto, to Dr. Sandra Wagner and to Ricardo Nogueira for helping with recruitment of HIV-1 patients and co-infected patients. To Dr. Filipe Carvalho-Costa for helpful assistance with statistical analysis. We would like to thank the following funding agencies for support of our work: Programa Nacional de DST/AIDS, Ministério da Saúde (grant ED00095/2007) and Instituto Oswaldo Cruz (internal funds). JRSO is a fellowship of CNPq. AMC is a researcher fellowship from CNPq and FAPERJ.

## Author details

<sup>1</sup>Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, CEP 21040-360, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, CEP 21040-360, Brazil. <sup>3</sup>Hospital-Dia Profa. Esterina Corsini, Hospital Universitário, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Mato Grosso do Sul, CEP 79070-900, Brazil. <sup>4</sup>Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. CEP 05403-010, São Paulo, Brazil. <sup>5</sup>Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Universidade de São Paulo, São Paulo, CEP 05403-010, Brazil. <sup>6</sup>Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, IPEC - FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, CEP 21040-360, Brazil.

## Authors' contributions

JRSO, AMC participated in the conception and design of the study; analysis and interpretation of data, drafting the paper, CBGG and MGM - participated in the conception and design of the study, analysis and interpretation of data, or substantially revising it. PAO, VSA, JALL, HG, MPON, MSM and BG - participated in the recruitment and follow up of the patients of this study. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript.

Received: 26 January 2010 Accepted: 20 December 2010  
Published: 20 December 2010

## References

- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer 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, **21**:334-359.
- Coura JR, Galvão-Castro B, Grimaldi G: **Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987, **82**:581-582.
- Da-Cruz AM, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho Z, Machado ES, Coutinho SG: **Cellular immune responses to *Leishmania braziliensis* in patients with AIDS-associated American cutaneous leishmaniasis.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, **94**:569-571.
- Couppié P, Clyti E, Sobesky M, Bissuel F, Del Giudice P, Saint-Marie D, Debret JP, Carme B, Pradinaud D: **Comparative study of cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients and non-HIV-infected patients in French Guiana.** *Br J Dermatol* 2004, **151**:1165-1171.
- Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, Goto H: **Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World.** *Br J Dermatol* 2009, **160**:311-318.
- Padovese V, Terranova M, Toma L, Bamabas GA, Morrone A: **Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Tigray, northern Ethiopia: clinical aspects and therapeutic concerns.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009, **103**:707-711.
- Rabello A, Orsini M, Disch J: ***Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal.** *Ann Trop Med Parasitol* 2003, **97**:517-528.
- Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaró R, Johnson WD Jr: **Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated.** *J Clin Invest* 1989, **83**:860-864.
- Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N: **Immune responses in kala-azar.** *Indian J Med Res* 2006, **123**:245-266.
- Schriefer A, Wilson ME, Carvalho EM: **Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis.** *Curr Opin Infect Dis* 2008, **21**:483-488.
- Goto H, Prianti MG: **Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis.** *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2009, **51**:241-246.
- Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG: **T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2002, **9**:251-256.
- Zhao C, Papadopoulos B, Tremblay MJ: ***Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network.** *Clin Immunol* 2004, **113**:81-88.
- Cacopardo B, Nigro L, Preiser W, Fama A, Satariano MI, Braner J, Celesia BM, Weber B, Russo R, Doerr HW: **Prolonged Th2 cell activation and increased viral replication in HIV-*Leishmania* co-infected patients despite treatment.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996, **90**:434-435.
- Wolday D, Akuffo H, Fessahaye G, Valentine A, Britton S: **Live and killed human immunodeficiency virus type-1 increases the intracellular growth of *Leishmania donovani* in monocyte-derived cells.** *Scand J Infect Dis* 1998, **30**:29-34.
- 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**:846-854.
- Lopez-Velez R, Casado J, Pintado V: **Decline of a visceral leishmaniasis epidemic in HIV-infected patients after the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART).** *Clin Microbiol Infect* 2001, **7**:394-395.
- Del Giudice P, Mary-Krause M, Pradier C, Grabar S, Dellamonica P, Marty P, Gastaut JA, Costagliola D, Rosenthal E, the clinical Group of the French Hospital Database on HIV: **Impact of highly active antiretroviral therapy on the incidence of visceral leishmaniasis in a French Cohort of patients infected with human immunodeficiency virus.** *J Infect Dis* 2002, **186**:1366-1370.
- Casado JL, Lopez-Velez R, Pintado V, Quereda C, Antela A, Moreno S: **Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001, **20**:202-205.
- Nigro L, Rizzo ML, Vancheri C, La rosa R, Mastruzzo C, Tomaselli V, Ragusa A, Manuele R, Cacopardo B: **CCR5 and CCR3 expression on T CD3<sup>+</sup> lymphocytes from HIV/*Leishmania* co-infected subjects.** *Med Microbiol Immunol* 2007, **196**:253-255.
- Preiser W, Cacopardo B, Nigro L, Braner J, Nunnari A, Doerr HW, Weber B: **Immunological findings in HIV-*Leishmania* coinfection.** *Intervirology* 1996, **39**:285-288.
- 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**:289-295.
- 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<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T cells predict the decline of CD4<sup>+</sup> T cells in HIV-infected patients.** *AIDS* 1996, **10**:827-834.
- Benito JM, Lopez M, Lozano S, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V: **CD38 expression on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004, **20**:227-233.
- Douek D, Roederer M, Koup R: **Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS.** *Annu Rev Med* 2009, **60**:471-484.
- Bentwich Z, Kalinkovich A, Weisman Z: **Immune activation is a dominant factor in the pathogenesis of African AIDS.** *Immunity Today* 1995, **16**:187-191.
- Rodrigues DS, Cunha RM, Kallas EG, Salomão R: **Distribution of naive/effector CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and expression of CD38 on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in AIDS patients with tuberculosis.** *Braz J Infect Dis* 2003, **7**:161-165.
- Gonzalez VD, Falconer K, Blom KG, Reichard O, Mørn B, Laursen AL, Weis N, Alaeus A, Sandberg JK: **High levels of chronic immune activation in the T-cell compartments of patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 and on highly active antiretroviral therapy are reverted by alpha interferon and ribavirin treatment.** *J Virol* 2009, **83**:11407-11411.
- Maidana-Giret MT, Silva TM, Sauer MM, Tomiyama H, Levi JE, Bassichetto KC, Nishiya A, Diaz RS, Sabino EC, Palacios R, Kallas EG: **GB virus type C infection modulates T-cell activation independently of HIV-1 viral load.** *AIDS* 2009, **23**:2277-2287.
- Jacobson MA, Dittmer DP, Sindair E, Martin JN, Deeks SG, Hunt P, Mocarski ES, Shiboski C: **Human herpesvirus replication and abnormal CD8<sup>+</sup> T cell activation and low CD4<sup>+</sup> T cell counts in antiretroviral-suppressed HIV-infected patients.** *PLoS One* 2009, **4**:e5277.
- Mattos M, Caiza A, Fernandes O, Gonçalves AJ, Pirmez C, Souza CSF, Oliveira-Neto MP: **American cutaneous leishmaniasis associated with HIV infection: report of four cases.** *J Eur Acad Dermatol Venerol* 1998, **10**:218-225.
- Daher ED, Fonseca PP, Gerhard ES, Silva Leitão TD, Silva GB Junior: **Clinical and epidemiological features of visceral leishmaniasis and HIV co-infection in 15 patients from Brazil.** *J Parasitol* 2008, **2**:1.
- McCune JM: **The dynamics of CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in HIV disease.** *Nature* 2001, **410**:974-979.
- Benito JM, López M, Lozano S, González-Lahoz J, Soriano V: **Down-regulation of interleukin-7 receptor (CD127) in HIV infection is associated with T cell activation and is a main factor influencing restoration of CD4(+) cells after antiretroviral therapy.** *J Infect Dis* 2008, **198**:1466-73.
- Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV: **Elevated CD38 antigen expression on CD8<sup>+</sup> T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4<sup>+</sup> cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression.** *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retroviral* 1997, **16**:83-92.

## Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/358/prepub>

doi:10.1186/1471-2334-10-358

Cite this article as: Santos-Oliveira et al: High levels of T lymphocyte activation in *Leishmania*-HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load. *BMC Infectious Diseases* 2010 10:358.

## Artigo 2 (publicado)

**Título:** “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”

**Autores:** Joanna R. Santos-Oliveira, Alda M. Da-Cruz, Lucy H.S. Pires, Elisa Cupolillo, Katrin Kuhls, Carmem B.W. Giacoia-Gripp e Manoel P. Oliveira-Neto.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2011; 85(1): 55-59

## RESUMO

A leishmaniose é considerada uma doença oportunista emergente em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) com uma apresentação clínica consideravelmente variável. Nós relatamos um paciente com leishmaniose visceral que apresentou aspectos clínicos inesperados (lesões cutâneas atípicas que apareceram após longo tempo de evidência da leishmaniose visceral). O paciente apresentou hepatoesplenomegalia na ausência de febre, mas era saudável. A carga viral estava baixa apesar da imunossupressão grave (baixa proliferação de linfócitos e níveis baixos de IFN- $\gamma$ , concomitante com um status elevado de ativação linfocitária). Surpreendentemente, duas cepas de *Leishmania* foram isoladas do paciente: uma da medula óssea (típica sequência de *L.infantum* MON-1, tipo A) e a outra da pele (sequência de *L.donovani* MON-2); esta segunda cepa não tinha sido previamente identificada no Brasil. A associação da leishmaniose visceral e da síndrome da imunodeficiência adquirida/HIV é uma doença amplamente desconhecida, particularmente em áreas nas quais a leishmaniose não é endêmica. Tais casos atípicos indicam que esta doença pode não ser diagnosticada em ambientes clínicos.



## 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

Joanna R. Santos-Oliveira, Alda M. Da-Cruz, Lucy H. S. Pires, Elisa Cupolillo, Katrin Kuhls, Carmem B. W. Giacoia-Gripp, and Manoel P. Oliveira-Neto\*

Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, e Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; Secretaria Municipal de Saúde de Cabo Frio, Brazil; Institute of Microbiology and Hygiene, Charité University Medicine Berlin, Berlin, Germany

**Abstract.** Leishmaniasis is considered an emerging opportunistic disease in human immunodeficiency virus (HIV)–infected patients who have considerably variable clinical presentation. We report a patient with visceral leishmaniasis who had unexpected clinical aspects (atypical cutaneous lesions appearing after long-term evidence of visceral parasites). The patient had hepatosplenomegaly in the absence of fever, but was otherwise generally healthy. The HIV viral load was low despite severe immunosuppression (low lymphocyte proliferation and low level of interferon- $\gamma$ , concomitant with a high lymphocyte activation status). Surprisingly, two *Leishmania* strains were isolated from his bone marrow (typical *L. infantum* sequence MON-1, type A) and skin (*L. donovani* MON-2 sequence); this second strain had not been previously identified in Brazil. The association of visceral leishmaniasis and HIV/acquired immunodeficiency syndrome is a largely unknown disease, particularly in areas in which leishmaniasis is not endemic. Such atypical cases indicate that this disease can be undiagnosed in clinical settings.

### INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) is endemic to different regions of Brazil and is, similar to that in other parts of the world, predominantly a childhood disease. In adult cases, co-infection with human immunodeficiency virus (HIV) emerges as an important predisposing factor for reactivation.<sup>1</sup> Fever, hepatosplenomegaly, and weight loss are the main symptoms of VL, and the clinical picture is similar in patients infected with HIV and those not infected with HIV. However, certain features are more frequently described for patients co-infected with *Leishmania* and HIV. These features include several relapses after appropriate therapy, atypical parasite locations, and skin involvement.<sup>2</sup>

Cutaneous lesions may occur before or after visceral infection and show a considerably variable dermatologic aspect that includes macules,<sup>3</sup> papules,<sup>4</sup> nodules,<sup>5</sup> or ulcers.<sup>6</sup> Leishmaniasis in immunocompromised patients appears in advanced stages of HIV infection and shows CD4<sup>+</sup> T cell counts less than 200 cells/mm<sup>3</sup> in most patients.<sup>7</sup> Cutaneous lesions in a persons co-infected with VL and HIV may occur by dissemination after an external infection<sup>2,8</sup> or reactivation after a latent infection.

We report a severely immunocompromised patient with cutaneous lesions that appeared after a long time of visceral disease. Because *Leishmania* parasites could be observed in blood smears of patients co-infected with VL and HIV<sup>2,8</sup> we hypothesized that cutaneous lesions in our patient were the result of hematogenic dissemination of visceral disease. Such a hypothesis was strengthened by histologic appearance of cutaneous lesions; *Leishmania* parasites were observed in deep dermis under normal-appearing epidermis and papillary-medial dermis (Figure 1). A follow-up study of the immunologic state of the patient was conducted up to one year after treatment for leishmaniasis has ended.

\*Address correspondence to Manoel P. Oliveira-Neto, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: manoel.paes@ipecc.fiocruz.br

### CASE REPORT

Written informed consent was obtained from the patient for publication of this case report. A 39-year-old man from Brazil, originally from Rio Grande do Norte and a resident of the Rio de Janeiro State, was diagnosed with pulmonary tuberculosis and HIV infection in 1998. The patient had traveled throughout different countries in South America but had never traveled outside South America. Treatment for tuberculosis and antiretroviral therapy (azidothymidine and lamivudine [AZT/3TC]) were administered.

In 2002, highly active antiretroviral therapy was initiated. This treatment was composed of two nucleoside analogs, reverse transcriptase inhibitors (lamivudine and tenofovir) and protease inhibitors (lopinavir and ritonavir). After this treatment, the patient reported mild abdominal pain, occasional nausea, and gastric fullness. A physical examination showed hepatosplenomegaly, and a hepatic histopathologic analysis by using serologic tests identified infection with hepatitis C virus. The HIV viral load was < 80 copies/mL, as quantified by a nucleic acid sequence–based amplification assay (Organon Teknika, Durham, NC). However, CD4<sup>+</sup> T cell counts were not available.

After one year of the above-mentioned treatment schedule for infection with HIV, the immunologic profile remained similar; it showed identical levels of viral load (< 80 copies/mL) and a CD4<sup>+</sup> T cell count of 33 cells/mm<sup>3</sup>. In 2004, the abdominal volume was increased, and abdominal computerized tomography showed homogenous hepatosplenomegaly. At this time, the patient had pancytopenia, and levels of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were maintained. The viral load, as evaluated elsewhere by the same HIV/RNA technique, showed a low level of plasmatic virus (540 copies/mL). In 2005, the patient had asymptomatic, erythematous lumps on the trunk and face, but despite low CD4<sup>+</sup> T lymphocyte cell counts, HIV-1 RNA was not detected.

In 2006, the patient was admitted to the Instituto de Pesquisa Evandro Chagas/FIOCRUZ for evaluation of cutaneous lesions. On physical examination, the patient appeared emaciated and chronically ill. However, his vital signs were

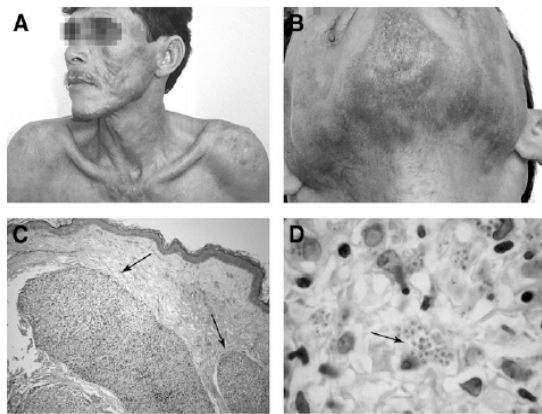


FIGURE 1. Clinical aspects of lesions on the face and chest (A) and chin (B) of the patient. Also shown are compact inflammatory infiltrate on deep dermis under normal epidermis (C) and numerous amastigotes on an inflammatory infiltrate (D). This figure appears in color at [www.ajtmh.org](http://www.ajtmh.org).

normal. The liver was palpable 8 cm below the costal edge, and the spleen was palpable at the umbilical level. There was no fever. Cervical, axillary, and inguinal lymphadenopathy were detected. Cutaneous lesions, i.e., elevated, erythematous papules and plaques were noted on the trunk, cheeks, and chin (Figure 1A and B). Blood cell counts were as follows: erythrocytes,  $2.9 \times 10^6$  cells/ $\mu\text{L}$ ; leukocytes,  $2.4 \times 10^3$  cells/ $\mu\text{L}$ ; hemoglobin, 8.2 g/dL; and platelets,  $12.6 \times 10^4$  cells/ $\mu\text{L}$ . The creatinine level was 3.3 mg/dL (291.7  $\mu\text{mol/L}$ ), and blood urea nitrogen level was 57 mg/dL (20.4 mmol/L).

Fragments of trunk lesions and bone marrow aspirate were submitted for histopathologic analysis, mycological culture, parasite isolation by using Novy-MacNeal-Nicolle culture medium, and polymerase chain reaction detection of *Leishmania* DNA. Histopathologic analysis of the skin showed normal epidermis. However, in the mid- and deep dermis, great masses of granulomatous inflammatory infiltrate and numerous amastigotes within macrophages and in the intercellular spaces were noted (Figure 1C and D). Histopathologic analysis of bone marrow showed numerous amastigotes. Culture in NNN medium was positive for *Leishmania*. Silver impregnation, Wade staining, and mycological culture were negative for fungal elements. Re-examination of the hepatic histopathologic sample from 2002 showed numerous amastigotes (Figure 2), indicating that visceral leishmaniasis had had a long-term clinical course (at least five years) before the skin dissemination.

Results for restriction fragment length polymorphism assays specific for the *hsp70* *Leishmania* gene were positive for the skin and bone marrow samples. Parasites from these samples were identified as *L. donovani* complex. Two *Leishmania* isolates were obtained and characterized by enzyme electrophoresis<sup>10</sup>: one from the cutaneous lesion (IOC/L2930-MHOM/BR/2007/JFF) and one from bone marrow (IOC/L3020-MHOM/BR/2007/JFF\_BM). IOC/L2930 was characterized as *L. infantum* IOC/Z1. Strain IOC/L3020 differed from IOC/L2930 in the 6-phosphogluconate dehydrogenase profile. The internal transcribed spacer (ITS)–5.8S–ITS2 ribosomal DNA region of both strains was sequenced. IOC/L3020 has a typical *L. infantum* sequence (MON-1, type A),<sup>11</sup> and IOC/L2930 had an *L. donovani* MON-2 sequence (Genbank accession numbers FN398343

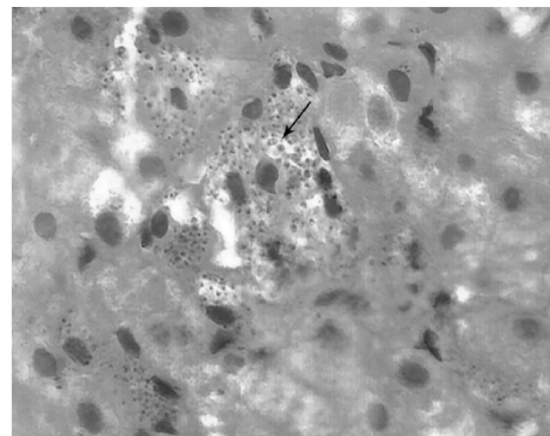


FIGURE 2. Histopathologic aspect of the liver of the patient, showing numerous amastigote forms of *Leishmania* sp. This figure appears in color at [www.ajtmh.org](http://www.ajtmh.org).

and FN398344 for IOC/L3020 and IOC/L2930, respectively). Multilocus microsatellite typing<sup>12,13</sup> confirmed this data.

When cutaneous leishmaniasis was diagnosed, Montenegro's skin test was negative, and results of immunofluorescent assay was positive at a dilution of 1/720. The CD4<sup>+</sup> T absolute counts were  $< 50$  cells/ $\text{mm}^3$ , and the plasmatic viral load was undetectable as measured by bDNA technology (Versant<sup>®</sup> HIV RNA 3.0 assay; Siemens, Tarrytown, NY (Figure 3A). After a cumulative dose of 3 g of amphotericin B, cutaneous lesions were reduced to mild erythema. However, the hepatosplenomegaly persisted with no improvement. Bone marrow histopathologic analysis showed no parasites, and culture for *Leishmania* was also negative.

Three months after anti-*Leishmania* therapy, the patient had fever and a new erythematous papule on the skin (Figure 4A). Histopathologic analysis showed a granulomatous reaction and several amastigotes. The patient was re-treated with pentavalent antimony at a dose of 20 mg of Sb<sup>+</sup>/kg/day for 3 weeks. Four weeks after the end of the antimonial therapy, only mild erythema and purpuric lesions on the legs were observed (Figure 4B). We considered several differential diagnoses for the purpuric lesions: papular-purpuric gloves and socks syndrome, B19 parvovirus infection, early manifestations of Kaposi's sarcoma, a coagulation defect linked to low platelet counts or lack of certain coagulation factors, or initial lesions of bacillary angiomatosis. However, the patient refused further investigations, and a precise diagnosis could not be ascertained.

A qualitative analysis of cellular immune responses was performed during the clinical follow-up as described elsewhere.<sup>14,15</sup> High levels of T cell activation were observed during the active phase of leishmaniasis (first episode and relapse) (Figure 3B), as assessed by the expression of CD38 in CD8<sup>+</sup> T cells and HLA-DR in CD3<sup>+</sup> T cells.<sup>16</sup> The degree of activation decreased after therapy and was stably maintained during the remission phases, especially for HLA-DR (Figure 3C). Lymphocyte activation in response to *Leishmania* or HIV antigens (p-24 protein) *in vitro* was also assessed by lymphocyte proliferative response (LPR) assays and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) production.<sup>14</sup> The LPR in response to parasite or viral antigens was negative (stimulation index  $<$  minimal limit of 2.5)



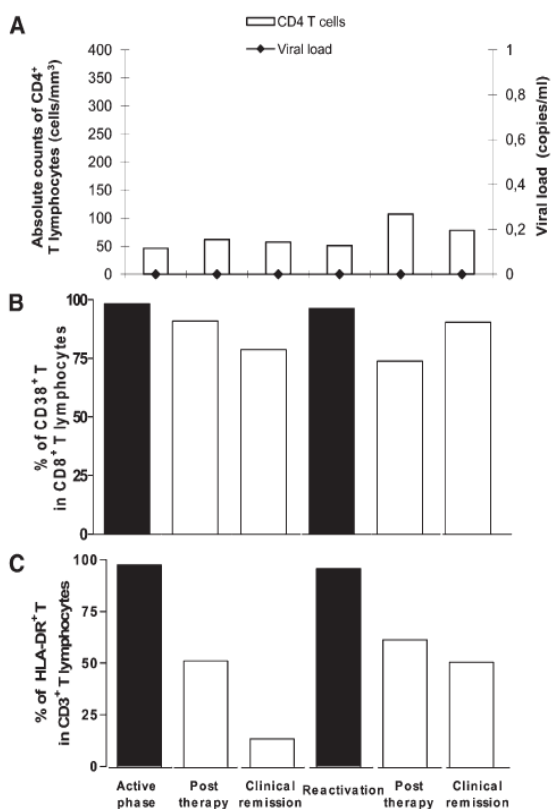


FIGURE 3. Analysis of the immune system commitment during the clinical follow-up of the patient co-infected with visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus (HIV). The patient was evaluated at the time of the first episode of visceral leishmaniasis (active phase), one month after antileishmanial therapy (post-therapy), during the period without signs or symptoms of leishmaniasis (clinical remission), and during relapses (reactivation). A, Absolute counts of circulating CD4<sup>+</sup> T lymphocytes/mm<sup>3</sup> and HIV viral load (RNA copies/mL). B, Population of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes expressing CD38 molecules. C, Population of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes expressing HLA-DR molecules.

at any time during follow-up, although the LPR was positive for the mitogen concanavalin A. Interferon- $\gamma$  (790 pg/mL) was detected in response to leishmanial antigens during the first episode of leishmaniasis, but no difference was noted between cultures with and without stimuli. However, the IFN- $\gamma$  production decreased progressively during clinical evolution, decreasing to levels of 15 pg/mL.

DISCUSSION

Patients co-infected with VL and HIV/acquired immunodeficient syndrome (AIDS) may have distinct atypical skin involvement,<sup>2,17</sup> such as cutaneous lesions. The pathogenesis of cutaneous lesions in an HIV-positive patient with VL is not clear<sup>18</sup> since amastigotes can also be observed in different types of skin lesions of HIV patients, such as Kaposi's sarcoma, herpes infections, and bacillary angiomatosis,<sup>18-20</sup> and in healthy skin.<sup>21</sup> Classically, cutaneous lesions associated with VL represent the well-known post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL)<sup>22</sup> which is an aftermath of visceral disease and is seen only after cure of systemic manifestations. Cutaneous lesions of PKDL include hypochromic or erythematous macules and

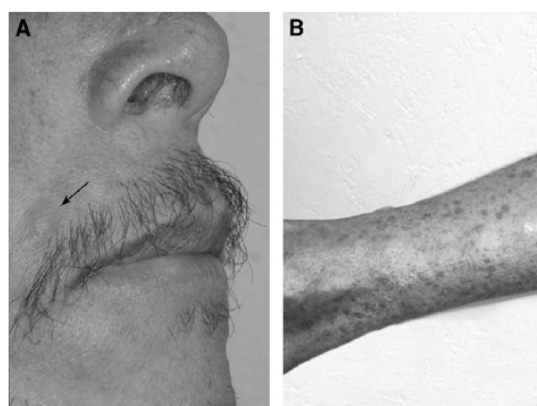


FIGURE 4. Clinical aspect of reactivation of cutaneous lesions on the face of the patient after treatment for visceral leishmaniasis (A) and purpuric lesions on a leg (B). This figure appears in color at www.ajtmh.org.

infiltrated plaques and nodules. Photosensitivity is present during PKDL, and there is a predominance of lesions on the face and upper thorax.<sup>22</sup> However, some cases of African kala-azar have cutaneous lesions and parasites in lymph nodes and bone marrow, a clinical presentation known as para-kala-azar dermal leishmaniasis.<sup>23</sup>

In our patient, the distribution of cutaneous lesions and their visual aspect were compatible with that of classical PKDL. The patient also showed features of African para-kala-azar dermal leishmaniasis, i.e., concomitance of cutaneous and visceral active disease and parasites present in the liver, bone marrow and skin. *Leishmania* spp. can be isolated from blood.<sup>24,25</sup> In the present case, based on the skin histopathologic analysis, which showed normal epidermis and great masses of infiltrate with many parasites in the deep and mid-dermis (Figure 1C and D), we hypothesized that hematologic dissemination could have occurred. Furthermore, the profound degree of immunodeficiency possibly facilitated survival of the parasite within macrophages.

The skin *Leishmania* isolate (IOC/L2930) was distinguished from the reference strain of Brazilian *L. infantum* (IOC/L579) and from the bone marrow isolate (IOC/L3020) by the mobility of 6-phosphogluconate dehydrogenase. This enzyme analysis suggested that the patient had a *Leishmania* mixed infection, which was confirmed by DNA sequence analysis. ITS rDNA sequence analysis and multilocus microsatellite typing indicated that the cutaneous lesion parasite was probably *L. donovani* MON-2, the most common zymodeme reported from India.<sup>26</sup> To our knowledge, MON-2 has never been isolated from cutaneous lesions. However, this zymodeme is closely related to MON-18 and MON-37, both of which are associated with cutaneous leishmaniasis in the Old World. The immunologic status of the patient probably contributed to the clinical manifestations observed.

Until now, *L. infantum* IOC/Z1 (i.e., MON-1) was the only species from the *L. donovani* complex associated with leishmaniasis in Brazil. Identification of *L. donovani* in this patient suggests that this parasite is circulating in Brazil or in other VL-endemic areas in South America as the patient traveled across different countries in South America without causing disease or being identified. The immunocompromised status probably favored the pathologic damage caused by this species.

Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS induce lymphocyte depletion, polyclonal activation, and cytokine dysregulations, and showed a synergy in their immunodeficiency mechanisms that aggravates both diseases.<sup>27</sup> This fact could explain the maintenance of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte counts < 100 cells/mm<sup>3</sup> despite the administration of anti-leishmanial therapy and successful highly active antiretroviral therapy (undetectable viral load during follow-up).

Although immunologic discordance<sup>28</sup> could have occurred in this patient, we cannot exclude that lymphopenia was a consequence of VL pathogenesis.<sup>29</sup> It is intriguing that this patient was evaluated over a long period and showed a high *Leishmania* infection load plus severe immunosuppression without affecting the viral load.

This case of co-infection with VL and HIV with long-term evolution of liver parasites is surprising, given the known severity of VL in HIV/AIDS patients.<sup>1</sup> The absence of fever in the patient and his good general clinical status could have contributed toward refuting the VL hypothesis. However, the newly revised guidelines in Brazil consider that hepatomegaly or splenomegaly with or without fever and cytopenia in AIDS patients must be investigated for VL.<sup>30</sup> The patient had three unexpected features: cutaneous lesions after dissemination of long-term VL parasites, infection by two viscerotropic strains, one of them not previously identified in Brazil, and low HIV viral load despite the severe immunosuppression status. The association between VL and HIV/AIDS is a largely unknown disease entity, especially in areas in which leishmaniasis is not endemic. The present case suggests that many such cases may pass undiagnosed in clinical practice, and that greater clinical awareness is needed for accurate diagnosis.

Received July 13, 2010. Accepted for publication October 12, 2010.

Acknowledgments: We thank Marcelo Alves Coelho Jr. (Photography and Documentation Sector, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas) for help with the figures and R. Pellegrino for secretarial assistance.

Financial support: This study was supported by Programa Nacional de DST/AIDS, Ministério da Saúde (grant ED00095/2007); Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas; Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (internal funds); Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; and the European Union (LeishEpinetSA, INCO-CT2005-015407). Joanna R. Santos-Oliveira was supported by a fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Alda M. Da-Cruz and Elisa Cupolillo were supported by fellowships from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Disclosure: None of the authors have any potential financial conflicts of interest.

Authors' addresses: Joanna R. Santos-Oliveira, Alda M. Da-Cruz, Elisa Cupolillo, and Carmem B. W. Giacoia-Gripp, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, E-mails: joannars@ioc.fiocruz.br, alda@ioc.fiocruz.br, ecupolillo@ioc.fiocruz.br, and carmembg@ioc.fiocruz.br. Lucy H. S. Pires, Secretaria Municipal de Saúde de Cabo Frio, São Cristóvão, Cabo Frio, Brazil, E-mail: lucypires@ig.com.br. Katrin Kuhls, Institute of Microbiology and Hygiene, Charité University Medicine Berlin, Berlin, Germany, E-mail: katrin.kuhls@o2online.de. Manoel P. Oliveira-Neto, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, E-mail: manoel.paes@ipecc.fiocruz.br.

## REFERENCES

- Russo L, Laguna F, Lopez-Velez R, Medrano FJ, Rosenthal E, Cacopardo B, Nigro L, 2003. Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections. *Ann Trop Med Parasitol* 97 (Suppl 1): S99–S105.
- Ara M, Maillou C, Peón G, Clavel A, Cuesta J, Grasa MP, Carapeto FJ, 1998. Visceral leishmaniasis with cutaneous lesions in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Br J Dermatol* 139: 114–117.
- Danden E, Peñas PF, Rios L, Jimenez M, Fraga J, Alvar J, García-Díez A, 1996. *Leishmania* presenting as dermatomyositis-like eruption in AIDS. *J Am Acad Dermatol* 35: 316–319.
- Botelho R, SanMartín O, Febrer MI 1990. Leishmaniasis cutaneo-visceral: una nueva infección oportunista en pacientes infectados con HIV. *Med Cut ILA* 18: 119–123.
- Perrin C, Taillan B, Hofman P, Mondain V, Lefichoux Y, Michiels JF, 1995. Atypical cutaneous histopathological features of visceral leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Dermatopathol* 17: 145–150.
- Colebunders R, Depraetera K, Verstraeten T, Lambert J, Hauben E, Van Marck E, Maurer T, Bañuls AL, Dujardin JC, 1999. Unusual cutaneous lesions in two patients with visceral leishmaniasis and HIV infection. *J Am Acad Dermatol* 41: 847–850.
- Mondain-Milton V, Toussaint-Gari M, Hofman P, Marty P, Carles M, De Salvador F, Miton F, Le Fichoux Y, Dellamonica P, 1995. Atypical leishmaniasis in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 21: 663–665.
- Calza L, D'Antuono A, Marinacci G, Manfredi R, Colangeli V, Passarini B, Orioli R, Varoli O, Chiodo F, 2004. Disseminated cutaneous leishmaniasis after visceral disease in a patient with AIDS. *J Am Acad Dermatol* 50: 461–465.
- da Silva LA, de Sousa Cdos S, da Graça GC, Porrozzis R, Cupolillo E, 2010. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol* 10: 77–83.
- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H, 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 50: 296–311.
- Kuhls K, Mauricio IL, Pratloug F, Presber W, Schonian G, 2005. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect* 7: 1224–1234.
- Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Presber W, Schonian G, 2006. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *J Clin Microbiol* 44: 495–503.
- Kuhls K, Keilonat L, Ochsenreither S, Schaar M, Schweynoch C, Presber W, Schonian G, 2007. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes Infect* 9: 334–343.
- Da-Cruz AM, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho Z, Machado ES, Coutinho SG, 2000. Cellular immune responses to *Leishmania braziliensis* in patients with AIDS-associated American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 569–571.
- Da-Cruz AM, Rodrigues AC, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Sabbaga-Amato V, Posada MP, Lindoso JA, Goto H, 2006. Alterações imunopatológicas na co-infecção HIV-*Leishmania*. *Rev Soc Bras Med Trop* 39 (Suppl 3): 75–79.
- Rodrigues DS, Cunha RM, Kallas EG, Salomão R, 2003. Distribution of naive/effector CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and expression of CD38 on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in AIDS patients with tuberculosis. *Braz J Infect Dis* 7: 161–165.
- Pourahmad M, Hooshmand F, Rahiminejad M, 2009. Cutaneous leishmaniasis associated with visceral leishmaniasis in a case of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Int J Dermatol* 48: 59–61.
- Herrera E, Bosch RJ, Fernández F, 1996. The presence and significance of *Leishmania* in mucocutaneous biopsies from HIV<sup>+</sup> patients with visceral leishmaniasis. *Eur J Dermatol* 6: 501–504.
- Barrio J, Lecona M, Cosin J, Olalquiaga FJ, Hernanz JM, Soto J, 1996. *Leishmania* infection occurring in herpes zoster lesions in a HIV patient. *Br J Dermatol* 134: 1641–6.
- Gallego MA, Aguilar A, Plaza S, Gomez JM, Burgos F, Agud JL, Marco J, García C, 1996. Kaposi sarcoma with an intense parasitization by *Leishmania*. *Cutis* 57: 103–105.

21. Yebra M, Segovia J, Manzano L, Vargas JA, Bernaldo de Quirós L, Alvar J, 1998. Disseminated-to-skin kala-azar and the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 108: 490–491.
22. Ramesh V, Singh R, Salotra P, 2007. Post-kala-azar dermal leishmaniasis: an appraisal. *Trop Med Int Health* 12: 848–851.
23. Zijstra EE, Khalil EA, Kager PA, El-Hassan AM, 2000. Post-kala-azar dermal leishmaniasis in Sudan: clinical presentation and differential diagnosis. *Br J Dermatol* 143: 136–143.
24. López-Velez R, Laguna F, Alvar J, Pérez-Molina JA, Molina R, Martínez P, Villarrubia J, 1995. Parasitic culture of buffy-coat for diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 33: 937–939.
25. Dereure J, Pratlong F, Reynes J, Basset D, Bastien P, Dedet JP, 1998. Haemoculture as a tool for diagnosing visceral leishmaniasis in HIV-negative and HIV-positive patients: interest for parasite identification. *Bull World Health Organ* 76: 203–206.
26. Pratlong F, Dereure J, Bucheton B, El-Saf S, Dessein A, Lanotte G, Dedet JP, 2001. Sudan: the possible original focus of visceral leishmaniasis. *Parasitology* 122: 599–605.
27. Cacopardo B, Nigro L, Preiser W, Fama A, Satariano MI, Braner J, Celesia BM, Weber B, Russo R, Doerr HW, 1996. Prolonged Th2 cell activation and increased viral replication in HIV-*Leishmania* co-infected patients despite treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 434–435.
28. Spritzler J, Mildvan D, Russo A, Asthana D, Livnat D, Schock B, Kagan J, Landay A, Haas DW, 2003. Adult AIDS Clinical Trials Group. *Clin Infect Dis* 37: 551–558.
29. Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N, 2006. Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res* 123: 245–266.
30. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil, 2004. *Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção Leishmania-HIV*. Brasília: Programa Nacional de DST/HIV/AIDS. Available at: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_leish\\_hiv.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_hiv.pdf).



### Artigo 3 (publicado)

**Título:** “Evidence that lipopolisaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis”

**Autores:** Joanna R. Santos-Oliveira, Eduardo G. Regis, Cássia R.B. Leal, Rivaldo V. Cunha, Patrícia T. Bozza, Alda M. Da-Cruz.

Plos Neglected Tropical Diseases 2011; 5(7): e1198.

#### RESUMO

**Introdução:** A leishmaniose visceral (LV) é caracterizada por uma imunossupressão específica ao parasito, além de uma intensa resposta pró-inflamatória. O Lipopolissacarídeo (LPS) tem sido implicado na ativação imune de doenças deficientes de células T, tais como HIV/AIDS e linfocitopenia idiopática. A fonte de LPS são as bactérias gram-negativas que entram na circulação devido à ruptura da barreira imunológica da mucosa. Uma vez que o parasitismo do intestino também ocorre na LV hipotetizou-se que o LPS pudesse estar elevado na leishmaniose, contribuindo para a ativação celular.

**Metodologia/Principais Resultados:** A análise de citometria de fluxo e os ensaios imunes (ELISA e sistema de micro-*beads* por luminex) foram utilizados para quantificar as células T e fatores solúveis. Níveis mais elevados de LPS e CD14 solúvel foram observados nos pacientes de LV na fase ativa da doença em comparação aos indivíduos saudáveis, indicando que o LPS estava bioativo; existiu uma correlação positiva entre essas moléculas ( $r = 0,61; p < 0,05$ ). Interessantemente, os níveis de LPS se correlacionaram negativamente com as contagens de células T CD4<sup>+</sup> ( $r = -0,71; p < 0,05$ ) e T CD8<sup>+</sup> ( $r = -0,65; p < 0,05$ ). Além disso, níveis maiores de moléculas associadas à ativação (HLA-DR, CD38, CD25) foram vistos nos linfócitos T, os quais foram positivamente correlacionados com os níveis de LPS. As citocinas pró-inflamatórias e o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) também estavam aumentados nos pacientes de LV. Consistente com o status mais elevado de ativação imune, os níveis de LPS foram positivamente correlacionados com as citocinas pró-inflamatórias IL-6 ( $r = 0,63; p < 0,05$ ), IL-8 ( $r = 0,89; p < 0,05$ ) e MIF ( $r = 0,64; p < 0,05$ ). Ainda, níveis mais altos da proteína intestinal ligadora de ácido graxo (IFABP) foram observados nos pacientes de LV, os quais correlacionaram com os níveis de LPS ( $r = 0,57; p < 0,05$ ).

**Conclusões/Significância:** Os níveis elevados de LPS nos pacientes de LV, em correlação com a ativação de células T e com as citocinas pró-inflamatórias e o MIF indicam que este produto bacteriano pode contribuir para o prejuízo da função imune efetora. A “tempestade de citocinas” e o status de hiperativação imune crônico podem contribuir para a depleção de células T observada. O LPS, provavelmente, tem como origem a translocação microbiana, como sugerido pelos níveis de IFABP e, ao lado da supressão imune mediada pelo antígeno de *Leishmania*, pode desempenhar um papel na imunopatogênese da LV. Esses achados apontam para os possíveis benefícios da profilaxia antimicrobiana em conjunção com a terapia anti-*Leishmania*.

# Evidence That Lipopolisaccharide May Contribute to the Cytokine Storm and Cellular Activation in Patients with Visceral Leishmaniasis

Joanna R. Santos-Oliveira<sup>1</sup>, Eduardo G. Regis<sup>2</sup>, Cássia R. B. Leal<sup>3</sup>, Rivaldo V. Cunha<sup>4</sup>, Patrícia T. Bozza<sup>5</sup>, Alda M. Da-Cruz<sup>1\*</sup>

**1** Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratório de Pesquisa sobre o Timo, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Mato Grosso do Sul, Brazil, **4** Departamento de Clínica Médica (FAMED), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Mato Grosso do Sul, Brazil, **5** Laboratório de Imunofarmacologia, Plataforma Luminex, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

## Abstract

**Background:** Visceral leishmaniasis (VL) is characterized by parasite-specific immunosuppression besides an intense pro-inflammatory response. Lipopolisaccharide (LPS) has been implicated in the immune activation of T-cell deficient diseases such as HIV/AIDS and idiopathic lymphocytopenia. The source of LPS is gram-negative bacteria that enter the circulation because of immunological mucosal barrier breakdown. As gut parasitization also occurs in VL, it was hypothesized that LPS may be elevated in leishmaniasis, contributing to cell activation.

**Methodology/Principal Findings:** Flow cytometry analysis and immunoassays (ELISA and luminex micro-beads system) were used to quantify T-cells and soluble factors. Higher LPS and soluble CD14 levels were observed in active VL in comparison to healthy subjects, indicating that LPS was bioactive; there was a positive correlation between these molecules ( $r = 0.61; p < 0.05$ ). Interestingly, LPS was negatively correlated with CD4<sup>+</sup> ( $r = -0.71; p < 0.01$ ) and CD8<sup>+</sup> T-cells ( $r = -0.65; p < 0.05$ ). Moreover, higher levels of activation-associated molecules (HLA-DR, CD38, CD25) were seen on T lymphocytes, which were positively associated with LPS levels. Pro-inflammatory cytokines and macrophage migration inhibitory factor (MIF) were also augmented in VL patients. Consistent with the higher immune activation status, LPS levels were positively correlated with the inflammatory cytokines IL-6 ( $r = 0.63; p < 0.05$ ), IL-8 ( $r = 0.89; p < 0.05$ ), and MIF ( $r = 0.64; p < 0.05$ ). Also, higher plasma intestinal fatty acid binding protein (IFABP) levels were observed in VL patients, which correlated with LPS levels ( $r = 0.57; p < 0.05$ ).

**Conclusions/Significance:** Elevated levels of LPS in VL, in correlation with T-cell activation and elevated pro-inflammatory cytokines and MIF indicate that this bacterial product may contribute to the impairment in immune effector function. The cytokine storm and chronic immune hyperactivation status may contribute to the observed T-cell depletion. LPS probably originates from microbial translocation as suggested by IFABP levels and, along with *Leishmania* antigen-mediated immune suppression, may play a role in the immunopathogenesis of VL. These findings point to possible benefits of antimicrobial prophylaxis in conjunction with anti-*Leishmania* therapy.

**Citation:** Santos-Oliveira JR, Regis EG, Leal CRB, Cunha RV, Bozza PT, et al. (2011) Evidence That Lipopolisaccharide May Contribute to the Cytokine Storm and Cellular Activation in Patients with Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 5(7): e1198. doi:10.1371/journal.pntd.0001198

**Editor:** Edgar M. Carvalho, Hospital Universitário, Brazil

**Received:** November 2, 2010; **Accepted:** April 11, 2011; **Published:** July 12, 2011

**Copyright:** © 2011 Santos-Oliveira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Financial support was provided by Programa Nacional de DST/AIDS, Ministério da Saúde (grant ED00095/2007) and Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (internal funds). JRS-O has a fellowship from CNPq. AMD-C has a researcher fellowship from CNPq and FAPERJ (JCNE). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

\* E-mail: alda@ioc.fiocruz.br

## Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a protozoan infection caused in Brazil by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. This disease represents an important worldwide public health problem and affects around 4,000 new cases per year in Brazil [1]. The parasite has a tropism to lymphoid organs, including the bone marrow, spleen, lymph nodes, and liver [2], which explains the immune abnormalities commonly found in affected patients.

VL is a systemic disease with a very complex host-parasite relationship. The parasite affects mainly cells of the macrophage

lineage and induces, to some extent, deviations in the production of erythrocytes, platelets, and lymphocytes, consequently generating anemia, thrombocytopenia, and decreased T-cell count [2]. The active phase of VL is characterized by an impairment of the specific effector T-cell response to leishmanial antigens, the absence of a delayed-type hypersensitivity reaction to parasite antigens and a decreased lymphocyte proliferative response, as well as the absence or low levels of interferon (IFN)- $\gamma$  and interleukin (IL)-2 cytokine production after *in vitro* stimulation of mononuclear cells with *Leishmania* antigens [3,4,5]. Elevated type 2 cytokine production has been detected in the serum of VL patients

### Author Summary

Visceral leishmaniasis (VL) affects organs rich in lymphocytes, being characterized by intense *Leishmania*-induced T-cell depletion and reduction in other hematopoietic cells. In other infectious and non-infectious diseases in which the immune system is affected, such as HIV-AIDS and inflammatory bowel disease, damage to gut-associated lymphocyte tissues occurs, enabling luminal bacteria to enter into the circulation. Lipopolisaccharide (LPS) is a bacterial product that stimulates macrophages, leading to the production of pro-inflammatory cytokines and other soluble factors such as MIF, which in turn activate lymphocytes. Continuous and exaggerated stimulation causes exhaustion of the T-cell compartment, contributing to immunosuppression.

Herein, we show that an increment in LPS plasma levels also occurs in VL; the higher the LPS levels, the lower the TCD4<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup> cell count in the blood. This T-cell depletion may affect the mucosal immune system, which, along with intestinal parasitization by amastigotes, may contribute to gut barrier damage and consequent microbial translocation. LPS levels were correlated with T-cell activation, pro-inflammatory cytokine plasma levels, MIF, and IFABP, showing that a bacterial molecule, probably from luminal origin, not associated with *Leishmania* infection can negatively affect the immune system. These findings points to possible benefits of antimicrobial prophylaxis in conjunction with anti-*Leishmania* therapy.

[6–8]. In addition, polyclonal activation of B cells and high levels of anti-leishmanial antibody titers are markers of this disease [2]. Restoration of the immune response to *L. chagasi*, as assessed by IFN- $\gamma$  production and lymphocyte proliferation, has been observed following specific treatment [9,10].

Interestingly, despite the severe impairment of the *Leishmania*-specific effector immune response, a number of typical markers of chronic activation of the immune system have paradoxically been detected. High levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines have been observed during active disease, but cytokine production returns to normal upon successful chemotherapy [8,10,11]. Although there is evidence that components of the parasite play a critical role in determining the immunological abnormalities observed in VL patients, the precise mechanisms underlying these alterations remain unknown [2,11,12].

Chronic immune activation has been observed in some infectious and non-infectious diseases, which can contribute to immune suppression and further progression of such illnesses. As an example, infection by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces chronic immune activation and leads to a severe suppression of the T lymphocyte compartment, caused mainly by CD4<sup>+</sup> T-cell depletion [13]. Early CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in the gastrointestinal tract of HIV-1-infected patients can cause a breach in the integrity of the mucosal immune system, enabling translocation of luminal microbial products into the circulation [14,15]. Bacterial components such as lipopolisaccharide (LPS) stimulate the adaptive and innate immune system, creating an inflammatory environment that results in a high turnover of T-cell populations, eventually leading to systemic immune impairment [16]. Such a phenomenon can be indirectly detected by measuring LPS plasma levels and has also been observed in conditions such as inflammatory bowel disease [17], idiopathic CD4 lymphocytopenia [18], and prior to hematopoietic transplantation [19].

LPS stimulates mononuclear cells via Toll-like receptor (TLR)-4 and promotes the secretion of a variety of inflammatory soluble factors such as IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and macrophage migration inhibitory factor (MIF) [20,21]. MIF occurs pre-formed and is rapidly released from many cell types in response to different stimuli, including endotoxemia [22]. MIF has also been implicated as a critical factor in the pathogenesis of a variety of inflammatory diseases [23,24] such as sepsis [25,26], tuberculosis [27], dengue fever [28], and HIV-1 infection [29].

This enhancement of intestinal permeability which results from mucosal damage and can potentially permits microbial translocation and lead to systemic activation has been assessed by plasma levels of intestinal fatty acid binding protein (IFABP). This cytosolic protein is expressed in the epithelium of small intestine, being released when the cell membrane integrity is compromised [30], such as in patients with abdominal trauma [31] and celiac disease [32].

Our hypothesis was that immunosuppression may also affect the gut mucosal barrier in VL, enabling translocation of microbial products into the systemic circulation. Therefore, we investigated whether plasma LPS levels were increased in VL patients, and the possible association with lymphocyte functions. For these purposes, quantization of T-cell subsets, cell activation status, pro-inflammatory cytokine and MIF, as well as LPS, and IFABP levels were measured in clinical samples from patients with VL.

### Materials and Methods

#### Patients and healthy subjects

Ten VL patients were enrolled in this study. Six were males, and the age of the patients ranged between 18 and 60 years (37 $\pm$ 19 years). Five patients had active disease without previous anti-*Leishmania* therapy, and 5 patients were evaluated after being cured. Additionally, 2 of the 5 patients with active disease were also subjected to post-therapy evaluation. VL diagnosis was confirmed by identification of amastigotes directly visualized in cells of Giemsa-stained bone marrow smears. Eight healthy subjects (HS) were included as controls; five were males, and the ages ranged between 24 and 32 years (27.2 $\pm$ 3 years). They presented a negative proliferative response *in vitro* to antigens of *L. chagasi*. Neither of the VL patients or healthy subjects presented HIV-1 infection, or any other co-morbidities. Patients were treated for VL according to the Brazilian Ministry of Health guidelines [1].

#### Ethics statement

This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Mato Grosso do Sul and by the Ethics Committee of the Fundação Oswaldo Cruz. Written informed consent was obtained from all participants prior to blood collection.

#### Immunologic assessments

CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> blood T lymphocytes were quantified by using a BD Tritest<sup>®</sup> monoclonal antibody specific for CD4, CD8, and CD3 conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), and peridinin chlorophyll protein (PerCP), respectively, and the BDTrue Count reagent kit was used (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Samples were acquired using a FACSCalibur (BD Biosciences, USA) and analyzed by Multiset software (BD, USA). The results are expressed as the number of cells/mm<sup>3</sup>.

To evaluate lymphocyte activation, peripheral blood mononuclear cells were obtained by centrifugation over a gradient of



Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Cells ( $10^5$  per tube) were stained with the following monoclonal antibody pairs: anti-CD8 FITC/anti-CD38 PE, anti-CD3 FITC/anti-HLA-DR PE (BD Simultest; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and anti-CD4 PE-Cy5/anti-CD25 PE (BD Biosciences Pharmingen, California, USA). After incubation, the cells were fixed with phosphate-buffered saline plus 1% paraformaldehyde and analyzed by flow cytometry. At least 10,000 events were acquired using a FACSCalibur (BD Biosciences, CA, USA), and phenotypic analysis was carried out by using CellQuest software (BD Biosciences, USA). Results are shown as the percentage of CD3<sup>+</sup> T, CD4<sup>+</sup> T, and CD8<sup>+</sup> T cells expressing HLA-DR, CD25, and CD38 on the membrane surface, respectively. Schematic flow cytometry analysis of T lymphocyte activation-associated molecules is provided in Figure S1 (HLA-DR, CD38, CD25).

#### Quantification of LPS, soluble CD14 (sCD14) and IFABP plasma levels

Plasma samples were collected after centrifugation of heparinized venous blood, which was aliquoted and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until the analysis. These samples were diluted in endotoxin-free water, and plasma LPS was quantified by a commercial assay kit (Limulus amoebocyte lysate QCL-1000; Cambrex, Milan, Italy) according to the manufacturer's protocol. The results are expressed as pg/mL and the minimum detected level was 10 pg/mL. The endotoxin levels were measured in leishmanial lysate to exclude any possibility of cross reaction between LPS and *Leishmania* derived LPS-like molecules. Plasma levels of sCD14 were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) assays (sCD14 Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); the results are expressed as ng/mL and the minimum detected level was 125 pg/mL. Plasma IFABP levels were determined using a human highly specific ELISA commercial kit (Duo Set; RD Systems, USA). The results are expressed as pg/mL and the detection limit was 31.2 pg/mL.

#### Cytokine measurement

A multiplex biometric immunoassay containing fluorescent dyed microbeads was used for plasma cytokine measurement (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The following cytokines were quantified: IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, MCP-1 and MIP-1 $\beta$ ; cytokine levels were calculated by Luminex technology (Bio-Plex Workstation; Bio-Rad Laboratories, USA). The analysis of data was performed using software provided by the manufacturer (Bio-Rad Laboratories, USA). A range of 0.51–8,000 pg/mL recombinant cytokines was used to establish standard curves and the sensitivity of the assay.

Plasma levels of MIF were measured using an ELISA commercial kit (Duo Set; RD Systems, USA), and the results are expressed as pg/mL; the minimum detected level was 31.2 pg/mL.

#### Statistical analysis

The Mann-Whitney test was used to compare data between groups, and correlations between different parameters were analyzed using the non-parametric Spearman's test. Statistical analysis was confirmed by the Kruskal-Wallis method. Analysis was performed with GraphPad Prism (GraphPad Software version 4.0 for Windows; San Diego, CA, USA). Data were presented as mean  $\pm$  standard deviation and median. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## Results

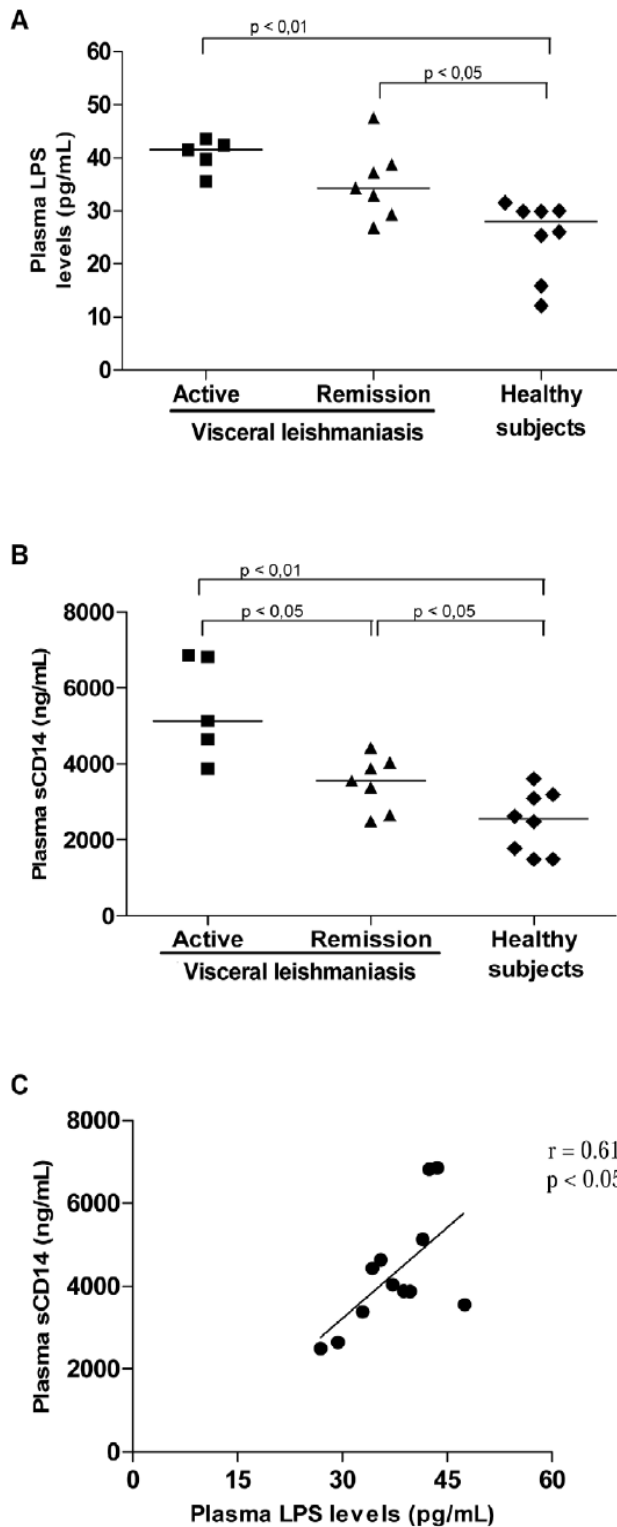
Considering that LPS is implicated in the pathogenesis of several immunodeficiency diseases, we examined whether an increment in LPS would also be a prevalent phenomenon in VL. Significantly higher mean levels of LPS were found in the plasma of VL patients ( $41 \pm 3.0$  pg/mL, median = 41.5 pg/mL,  $n = 5$ ) compared to HS ( $23 \pm 8.0$  pg/mL, median = 26 pg/mL,  $n = 8$ ;  $p < 0.01$ , Figure 1A). A tendency towards decreased LPS levels ( $35 \pm 6.0$  pg/mL, median = 34.3 pg/mL,  $n = 7$ ) was seen after therapy, although the levels were still higher than those observed in HS (Figure 1A).

Since it is known that LPS binds to monocytes/macrophages through the CD14 receptor and promotes the release of sCD14 [17], we measured plasma sCD14 levels to indirectly determine whether the LPS in the patients' blood was biologically active. VL patients presented increased levels of sCD14 (active VL:  $5,448 \pm 1,359$  ng/mL, median = 5,133 ng/mL,  $n = 5$ ) relative to HS ( $2,470 \pm 815$  ng/mL, median = 2,555 ng/mL,  $n = 8$ ;  $p < 0.01$ ). Decreased levels of sCD14 ( $3,491 \pm 712$  ng/mL, median = 3,556 ng/mL,  $n = 7$ ;  $p < 0.05$ ) were observed in the remission phase in comparison to before therapy (Figure 1B). In addition, a significant correlation between LPS and sCD14 plasma levels ( $r = 0.61$ ;  $p < 0.05$ ) was found, suggesting that LPS-induced cell stimulation can contribute to sCD14 secretion *in vivo*.

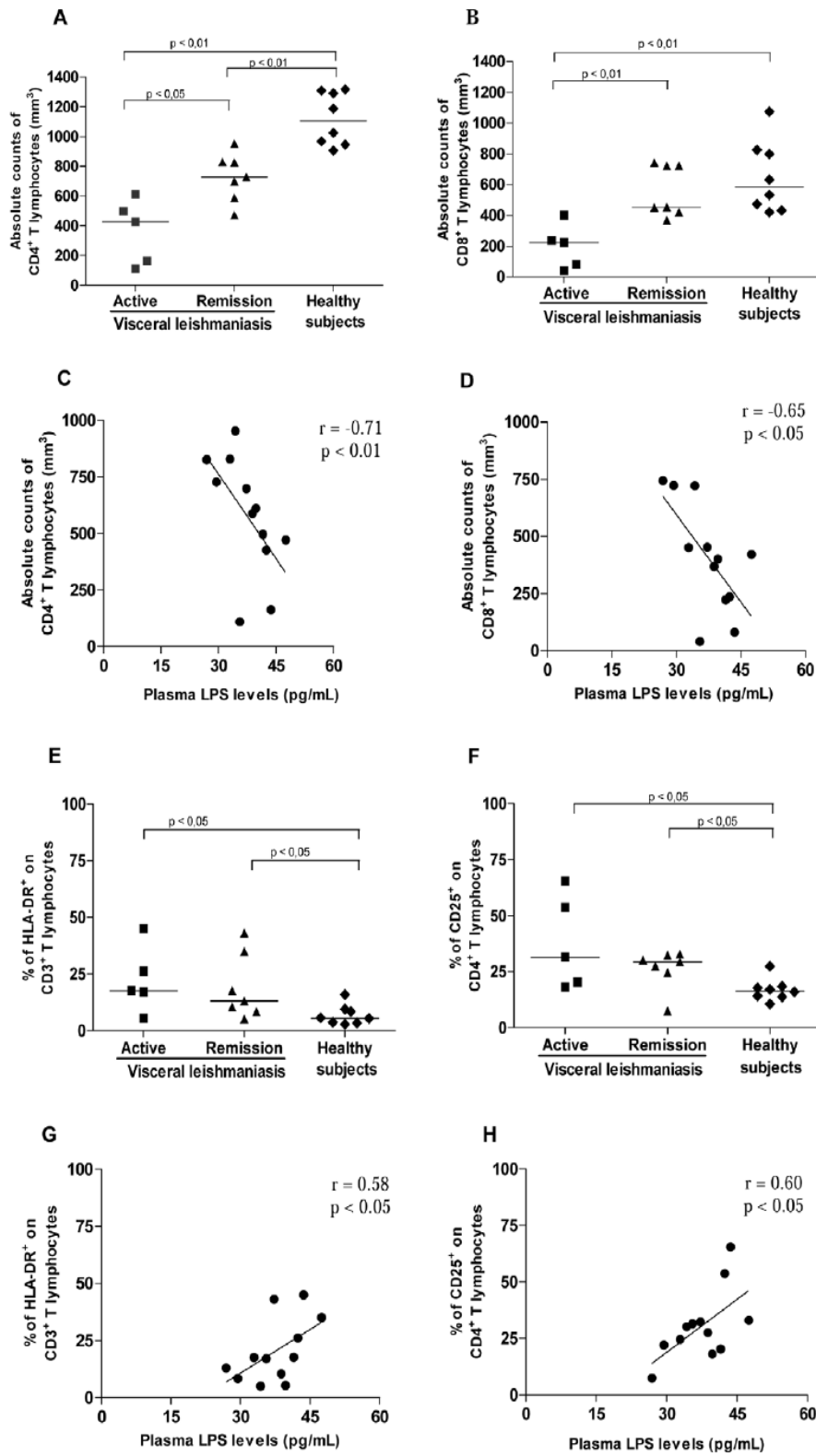
Further, the repercussions of the LPS increment on lymphocyte effector function were assessed by analyzing T-cell subset counts and cell activation status. Significantly lower numbers of CD4<sup>+</sup> T cells ( $361 \pm 200$  cells/mm<sup>3</sup>, median = 426 cells/mm<sup>3</sup>,  $n = 5$ ) and CD8<sup>+</sup> T cells ( $196 \pm 142$  cells/mm<sup>3</sup>, median = 223 cells/mm<sup>3</sup>,  $n = 5$ ) were observed during active disease in comparison to HS (TCD4<sup>+</sup> =  $1,118 \pm 175$  cells/mm<sup>3</sup>, median = 1,106 cells/mm<sup>3</sup>; TCD8<sup>+</sup> =  $649 \pm 230$  cells/mm<sup>3</sup>, median = 583 cells/mm<sup>3</sup>,  $n = 8$ ;  $p < 0.05$ ). After treatment, a partial recovery of T-cell counts was observed (TCD4<sup>+</sup> =  $727 \pm 160$  cells/mm<sup>3</sup>, median = 727 cells/mm<sup>3</sup>; TCD8<sup>+</sup> =  $555 \pm 166$  cells/mm<sup>3</sup>, median = 456 cells/mm<sup>3</sup>,  $n = 7$ ;  $p < 0.05$ ) in parallel to a satisfactory therapeutic response (Figure 2A and 2B). Active VL patients had a negative proliferative response *in vitro* to *L. chagasi* antigens (data not shown).

Higher mean levels of cellular activation were detected in VL patients, independently of the clinical phase of leishmaniasis, when compared to HS ( $p < 0.05$ , Figure 2E and 2F). However, patients in the active phase had the highest percentage of TCD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> cells ( $22.3 \pm 14\%$ , median = 18%) and TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells ( $38 \pm 20\%$ , median = 31.5%) when compared to HS (TCD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>:  $6.8 \pm 4.3\%$ , median = 5.5%; TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>:  $16.8 \pm 5\%$ , median = 16.5%). Interestingly, the levels of TCD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> cells (active VL =  $40 \pm 18.5\%$ , median = 40.5%; remission =  $45 \pm 7.3\%$ , median = 45.4%) were also augmented in VL patients (HS:  $31 \pm 4.4\%$ , median = 33%).

To understand whether the elevated LPS levels may be involved in the altered cellular activation status and lymphocyte counts seen in VL patients, correlation analyses were performed. Absolute counts of CD4<sup>+</sup> ( $r = -0.71$ ;  $p < 0.01$ ) and CD8<sup>+</sup> T cells ( $r = -0.65$ ;  $p < 0.05$ ) were negatively correlated with LPS (Figure 2C and 2D), showing that the lower T subset numbers were associated with the highest LPS levels during the active phase of leishmaniasis, whereas during clinical remission, the inverse was observed, i.e., the higher T CD4<sup>+</sup> counts were associated with the lowest LPS levels. Additionally, a significant positive correlation between plasma LPS levels and the frequency of cells with an activated phenotype, i.e., CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> ( $r = 0.58$ ;  $p < 0.05$ ) and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $r = 0.60$ ;  $p < 0.05$ ) T cells, was also found (Figure 2G and 2H).



**Figure 1. Plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and soluble CD14 in patients with visceral leishmaniasis (VL).** Increased LPS (A) and sCD14 (B) levels in VL patients. Correlation between LPS and sCD14 levels in VL patients (C). Active VL patients (solid squares), VL patients in remission (solid triangles), and healthy subjects (solid diamonds). Each point represents 1 subject. The horizontal bars indicate the median value. doi:10.1371/journal.pntd.0001198.g001



**Figure 2. T-cell subset levels and their activation status in patients with visceral leishmaniasis (VL).** A. Absolute counts of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. B. Absolute counts of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Correlation between lipopolysaccharide (LPS) plasma levels and the absolute counts of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (C) and absolute counts of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (D) in VL patients. E. Levels of HLA-DR<sup>+</sup> on CD3<sup>+</sup> T lymphocytes. F. Levels of CD25<sup>+</sup> on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. Correlation between LPS plasma levels and percentage of TCD3<sup>+</sup> cells expressing membrane HLA-DR<sup>+</sup> (G) and percentage of TCD4<sup>+</sup> cells expressing membrane CD25<sup>+</sup> (H) in VL patients. Active VL patients (solid squares), VL patients in remission (solid triangles), and healthy subjects (solid diamonds). Each point represents 1 subject. The horizontal bars indicate the median value.  
doi:10.1371/journal.pntd.0001198.g002

Another well described consequence of immune activation by LPS is the secretion of pro-inflammatory molecules. To understand whether this process also occurs in VL patients, cytokine concentrations were measured in the plasma of these patients. Similar to T-cell activation, plasma levels of pro-inflammatory cytokines were also elevated in VL patients, not only during active disease, but also up to 6 months after the end of therapy relative to HS (Table 1).

As LPS also stimulates the secretion of MIF, this molecule was also investigated. MIF was significantly elevated in active VL (33,180±7,273 pg/mL; median = 32,000 pg/mL, n = 5) when compared either with patients during clinical remission (19,348±7,690 pg/mL; median = 15,600 pg/mL, n = 7) or

with HS (7,400±3,763 pg/mL; median = 6,238 pg/mL, n = 8; Figure 3A). Even in the remission phase, MIF levels were still increased in comparison to HS ( $p < 0.05$ ). Consistent with the higher immune activation status, plasma LPS levels were positively correlated with the inflammatory cytokines IL-6 ( $r = 0.63$ ;  $p < 0.05$ ), IL-8 ( $r = 0.89$ ;  $p < 0.05$ ), and MIF ( $r = 0.64$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 3B, C, and D). The augmented MIF secretion, which correlated with LPS levels, may contribute to the enhanced LPS stimulation in these patients, due to the ability of MIF to up-regulate the cellular expression of TLR-4 [22].

Finally, we assessed the plasmatic IFABP levels, since this protein is released into the circulation on intestinal cell injury. VL patients showed higher levels of IFABP (944±484 pg/mL; median = 918 pg/mL, n = 5) in comparison to HS (223.4±133 pg/mL; median = 234 pg/mL, n = 8;  $p < 0.05$ , Figure 4A). The highest plasma IFABP values were observed during active disease, while remission VL patients presented decreased levels (809±299 pg/mL; median = 794 pg/mL, n = 7). A positive correlation was verified between IFABP and LPS levels ( $r = 0.57$ ;  $p < 0.05$ ), which may suggest some intestinal damage (Figure 4B).

**Table 1. Pro-inflammatory cytokine levels in the plasma of patients with visceral leishmaniasis (VL).**

Cytokines pg/mL	Active VL patients (n = 5)	VL patients in remission (n = 7)	Healthy subjects (n = 8)	p value*	p value**
IFN- $\gamma$	1,143 (454–4,446)	783 (367–3,482)	19 (5.3–145)	0.010	0.0010
TNF	143.5 (37.7–555)	100 (57.3–589)	2 (1.5–8.5)	0.001	0.0006
IL-2	35.3 (27–38.5)	62 (27.6–435)	6 (1–9)	0.001	0.0003
IL-6	416 (211–557)	49 (30–115)	1 (0.3–2.5)	0.004	0.0007
IL-8	8,000 (1,887–13,578)	4,325 (427–8,988)	2.5 (1.5–3.0)	0.008	0.0050
IL-1 $\beta$	9.7 (4–226)	7.5 (2–138)	0.5 (0.4–0.6)	0.001	0.0010
IL-17	288 (102–398)	193.5 (131–627)	2 (2–16)	0.002	0.0006
IL-4	42.3 (29.2–54.7)	35.0 (23.7–59.1)	5.0 (5–12.5)	0.007	0.0020
IL-5	9.4 (3.0–143)	2.9 (2.6–8.1)	0.4 (0.1–1.8)	0.030	0.0300
IL-10	13 (8.7–54.8)	12.6 (6.0–66)	1.0 (0.1–1.6)	0.001	0.0003
IL-12	16.6 (10.5–27)	34.0 (20.9–44.8)	1.0 (0.8–1.4)	0.004	0.0010
IL-13	5.8 (3.8–33)	8.3 (3.0–12)	1.1 (0.7–1.5)	0.001	0.0020
MCP-1	538 (285.7–606)	402 (327–966.8)	52 (31–95.8)	0.004	0.0003
MIP-1 $\beta$	730.3 (418–3,363)	571.5 (426–1,111)	14.3 (0.1–50)	0.001	0.0010

IFN: interferon, IL: interleukin, TNF: tumor necrosis factor, MCP1: monocyte chemoattractant protein-1, MIP: macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ .

Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test (\*\*\*) and confirmed by the Kruskal-Wallis method.

Data are presented as median (interquartile range).

\*Between active VL patients and healthy subjects.

\*\*Between VL patients in remission and healthy subjects.

doi:10.1371/journal.pntd.0001198.t001

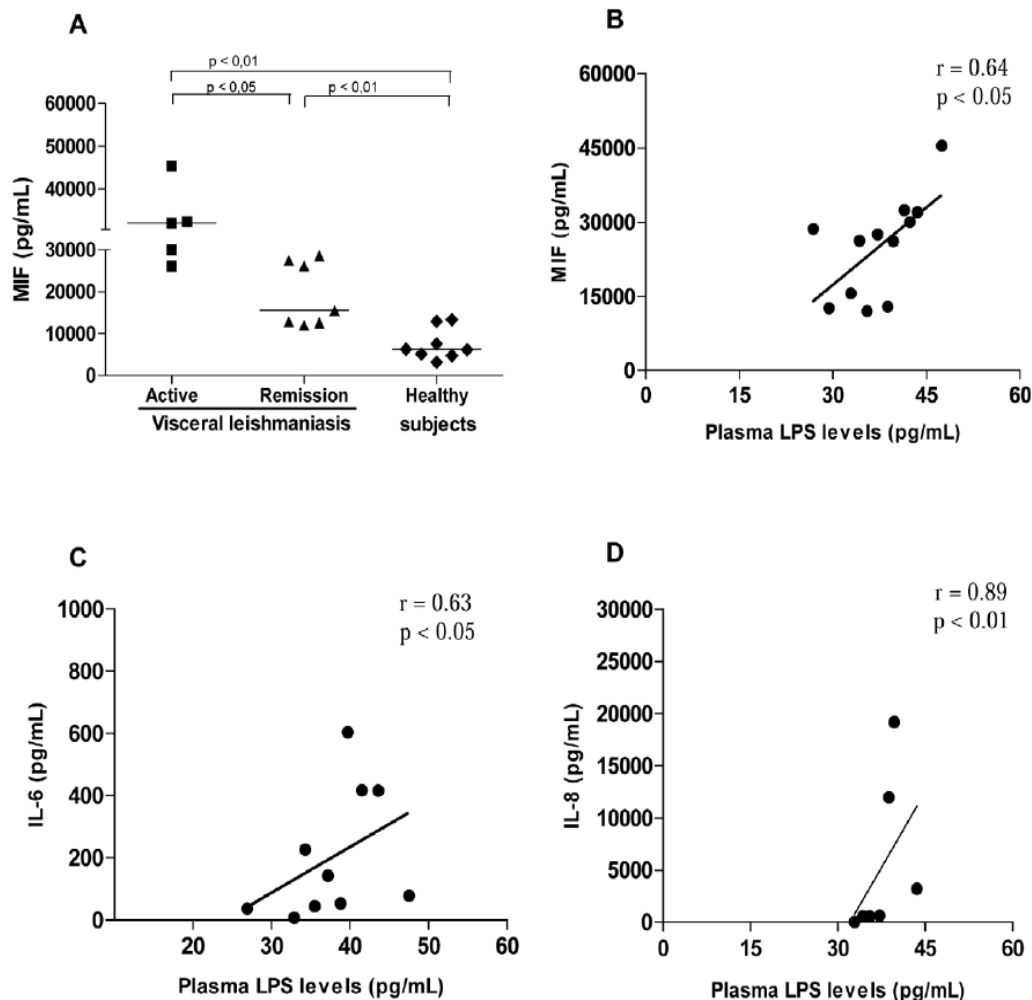
## Discussion

Several circulating molecules that act as soluble receptors for IL-2 [33], immunocomplexes, and lipoproteins [34] have been implicated in VL pathogenesis, but have not been proven to mediate immunosuppressive activity. In this study, it was demonstrated that LPS levels were elevated in VL patients in association with T-cell depletion, lymphocyte activation, and pro-inflammatory cytokine elevation, providing evidence that this factor may play a role in VL immunopathogenesis.

The elevated levels of plasma LPS detected in VL patients indicate that this substance may have a systemic biological effect. It is known that LPS acts via the TLR-4/CD14 receptor complex, leading to sCD14 secretion by monocytes/macrophages [17]. Thus, the elevated levels of sCD14 observed in VL patients in this study indicate that LPS was bioactive in these patients. Furthermore, LPS was positively correlated with sCD14 levels, reinforcing the idea that this microbial product could also contribute to cell activation mechanisms in VL.

Although suppression of the immune response is a hallmark mechanism associated with the development of VL, VL patients present with systemic immune activation as a consequence of pro-inflammatory cytokine release [8,11,35,36,37]. In this study, it was verified that T lymphocytes up-regulated surface HLA-DR, CD38, and CD25 levels, independently of the clinical phase of VL. These results show that T lymphocytes are also activated in VL, as has been demonstrated in other immunosuppressive diseases such as HIV/AIDS [13,38]. On the other hand, high lymphocyte activation can lead to death by apoptosis, thereby reducing the number of these cells [2,11,12]. In fact, the lowest counts of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were observed in patients with active VL, whereas recovery was marked by an increase in the number of these T-cells, which is probably related to the development of an effector response [8,9,37]. However, inasmuch as increased levels of these T-cell subsets has been observed during clinical remission, i.e., after successful therapy, these cell counts





**Figure 3. Plasma cytokine levels in visceral leishmaniasis (VL) patients and their association with lipopolysaccharide (LPS) levels. A.** Plasma macrophage migration inhibitory factor (MIF) levels in VL patients. Correlation between LPS plasma levels and MIF production (B), IL-6 production (C), and IL-8 production (D) in VL patients. Active VL patients (solid squares), VL patients in remission (solid triangles), and healthy subjects (solid diamonds). Each point represents 1 subject. The horizontal bars indicate the median value. doi:10.1371/journal.pntd.0001198.g003

were still lower in VL patients than in HS, as previously demonstrated [8,37].

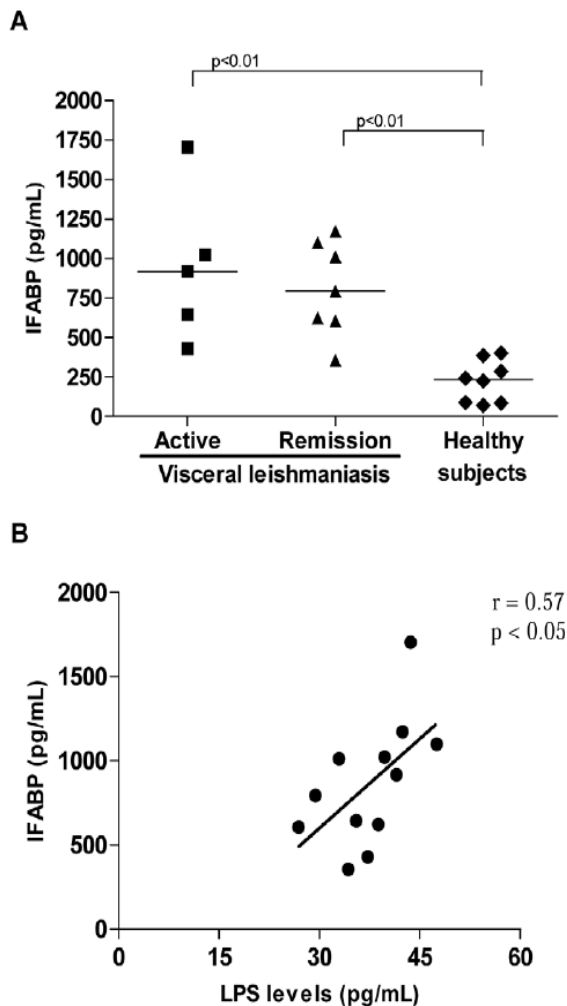
Interestingly, LPS levels in VL patients were negatively correlated with the absolute T CD4<sup>+</sup> and T CD8<sup>+</sup> cells counts, showing that higher LPS levels were associated with a lower number of T-cell subsets. In addition, a positive correlation between *ex vivo* cellular activation, represented by HLA-DR and CD25 molecules in T-cells, and plasma LPS levels was found. Firstly, considering that LPS stimulates macrophages to release pro-inflammatory factors such as IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and MIF [39], which in turn activate T-cells, it is conceivable that the presence of LPS in the blood stream may contribute to the compromised T-lymphocyte effector function in VL. Secondly, it may be hypothesized that, along with leishmanial antigens, LPS may also contribute to the elevated cellular immune activation in VL. In turn, this activation status can indirectly contribute to the impairment of T cell counts by a mechanism of cell death due to intense stimulation, as has been suggested in other infectious or

non-infectious diseases [16,17]. Even considering the negative correlation results between T cell counts and LPS levels, the approach utilized in this study do not allow a definitive conclusion regarding the causality between these parameters.

The VL patients studied here presented with a cytokine storm characterized by increased levels of pro-inflammatory (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, and MIF), anti-inflammatory (IL-4, IL-5, and IL-13), and regulatory cytokines (IL-10) and chemokines (IL-8, MCP, and MIP-1 $\beta$ ). These findings are similar to those for sepsis [26] and severe dengue fever [40]. Our results also reinforce early data in which a mixed cytokine profile was observed during VL disease [7,8,10,41,42]. The factors that lead to this systemic activation are still largely unknown. Our data suggest that LPS may play a role in this effect.

It is interesting to note that LPS levels were positively correlated with MIF, a pleiotropic cytokine released after cell exposure to microbial products [39] or to pro-inflammatory cytokines [42]. It is known that MIF up-regulates the expression of TLR-4, the





**Figure 4. Plasma levels of intestinal fatty acid binding protein (IFABP) in visceral leishmaniasis patients.** A. Elevated IFABP levels in VL patients. (B) Correlation between IFABP and LPS levels in VL patients. Active VL patients (solid squares), VL patients in remission (solid triangles), and healthy subjects (solid diamonds). Each point represents 1 subject. The horizontal bars indicate the median value. doi:10.1371/journal.pntd.0001198.g004

signal transducer molecule of the LPS receptor [20], leading to the production of inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8 [39,43]. Therefore, MIF production may contribute to the inflammatory milieu in VL patients and the enhancement in the susceptibility to LPS stimulation. As observed for the frequency of T-cells with an activated phenotype, IL-6 and IL-8 levels were also correlated with LPS. In septic patients, high MIF levels have been considered indicative of poor outcome, highlighting the potential therapeutic benefits of MIF neutralization [26]. Our results show that LPS may be contributing not only to the activation of circulating cells, but also to the inflammatory environment observed in VL patients, which may worsen the prognosis. Although LPS levels were lower after VL treatment, it remained higher than those in HS, as also observed for the other immunological parameters investigated. These results indicate that, despite the return of good general clinical status, the reestablishment of immune response homeostasis takes longer to occur. Alternatively, we should considerate that elevated LPS levels could be due to reduced LPS clearance by the kidneys.

The source of the microbial product LPS in the blood stream of VL patients needs to be elucidated. Although, bacterial infections are common complications in VL, none of the patients included in this study presented clinical evidence of such infection. Considering that systemic T-cell depletion can also affect gut-associated lymphoid tissues, as has been suggested for other immunosuppressive pathologies [18], one can suggest the hypothesis that microbial translocation into the blood circulation may also occur in VL. More importantly, gut damage has been extensively documented in VL patients [44–46], and cells are heavily parasitized by *Leishmania* amastigotes due to parasitization of mucosal cells, causing frequent diarrhea [45] that is likely to affect the function of this innate barrier. The elevated levels of IFABP, an important plasma marker of gut injury, indicate that intestinal permeability is increased in these patients. Thus, we believe that a vicious circle can be occurring in VL patients, in which systemic inflammation and cellular activation of VL *per se* [7,8,11,41] contributes to gut damage, leading to microbial translocation which in turn increase or sustain the systemic

activation status. The phenomenon of microbial translocation has previously been described in graft-versus-host disease [19], inflammatory bowel disease [17], and idiopathic lymphocytopenia [18]. In the context of infectious diseases, microbial translocation demonstrated in HIV-1 infection is associated with LPS-induced systemic immune activation, which indirectly affects the progression toward AIDS [16].

In summary, the present data show that LPS is elevated in VL and possibly contributes, along with *Leishmania* antigens, to the cytokine storm and immune activation status in this pathology. In this context, plasma LPS may be a biomarker suitable for assessing VL prognosis. Considering that LPS originates from gram-negative bacteria from the gut and may reach the blood stream after crossing the gut, the use of antimicrobial prophylaxis in conjunction with anti-*Leishmania* therapy may be beneficial for VL patients, as this strategy may reduce LPS-mediated immune activation in VL.

## References

1. Ministério da Saúde, Brasil. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (2009) Available: [http://portalsaude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/manual\\_leish\\_viscerar\\_serie\\_2006.pdf](http://portalsaude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/manual_leish_viscerar_serie_2006.pdf).
2. Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, et al. (2006) Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res* 123: 245–266.
3. Carvalho EM, Teixeira RS, Johnson WD Jr. (1981) Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect Immun* 33: 498–500.
4. Carvalho EM, Badaró R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD Jr. (1985) Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 76: 2066–2069.
5. Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaró R, Johnson WD Jr. (1989) Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest* 83: 860–864.
6. Karp CL, el-Safi SH, Wynn TA, Satti MM, Kordofani AM, et al. (1993) *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-azar: marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J Clin Invest* 91: 1644–1648.
7. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva LA, Rabello A, et al. (2006) 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* 146: 124–132.
8. Nylén S, Maurya R, Eidsmo L, Manandhar KD, Sundar S, et al. (2007) Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *J Exp Med* 204: 805–817.
9. Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman R, et al. (1994) Restoration of IFN- $\gamma$  production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 152: 5949–5956.
10. Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, et al. (2005) Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis* 5: 113–121.
11. Goto H, Prianti MG (2009) Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 51: 241–246.
12. Nylén S, Sacks D (2007) Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 28: 378–384.
13. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, et al. (1999) Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 179: 859–870.
14. Brechley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, et al. (2004) CD4<sup>+</sup> T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 749–759.
15. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, et al. (2004) Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 761–770.
16. Brechley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, et al. (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12: 1365–1371.
17. Caradonna L, Amati L, Magrone T, Pellegrino NM, Jirillo E, et al. (2000) Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res* 6: 205–214.
18. Lee PI, Ciccone EJ, Read SW, Asher A, Pitts R, et al. (2009) Evidence for translocation of microbial products in patients with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *J Infect Dis* 199: 1664–1670.

## Supporting Information

**Figure S1**  
(PDF)

## Acknowledgments

We would like to thank Dr. D Bou-Habbib for careful review of this manuscript and suggestions, to Dr. MED Cavalheiros for her help in patient diagnosis, and Dr. CBW Giacoia-Gripp and EF de Assis for laboratorial assistance. We would also like to thank R Pellegrino for secretarial assistance.

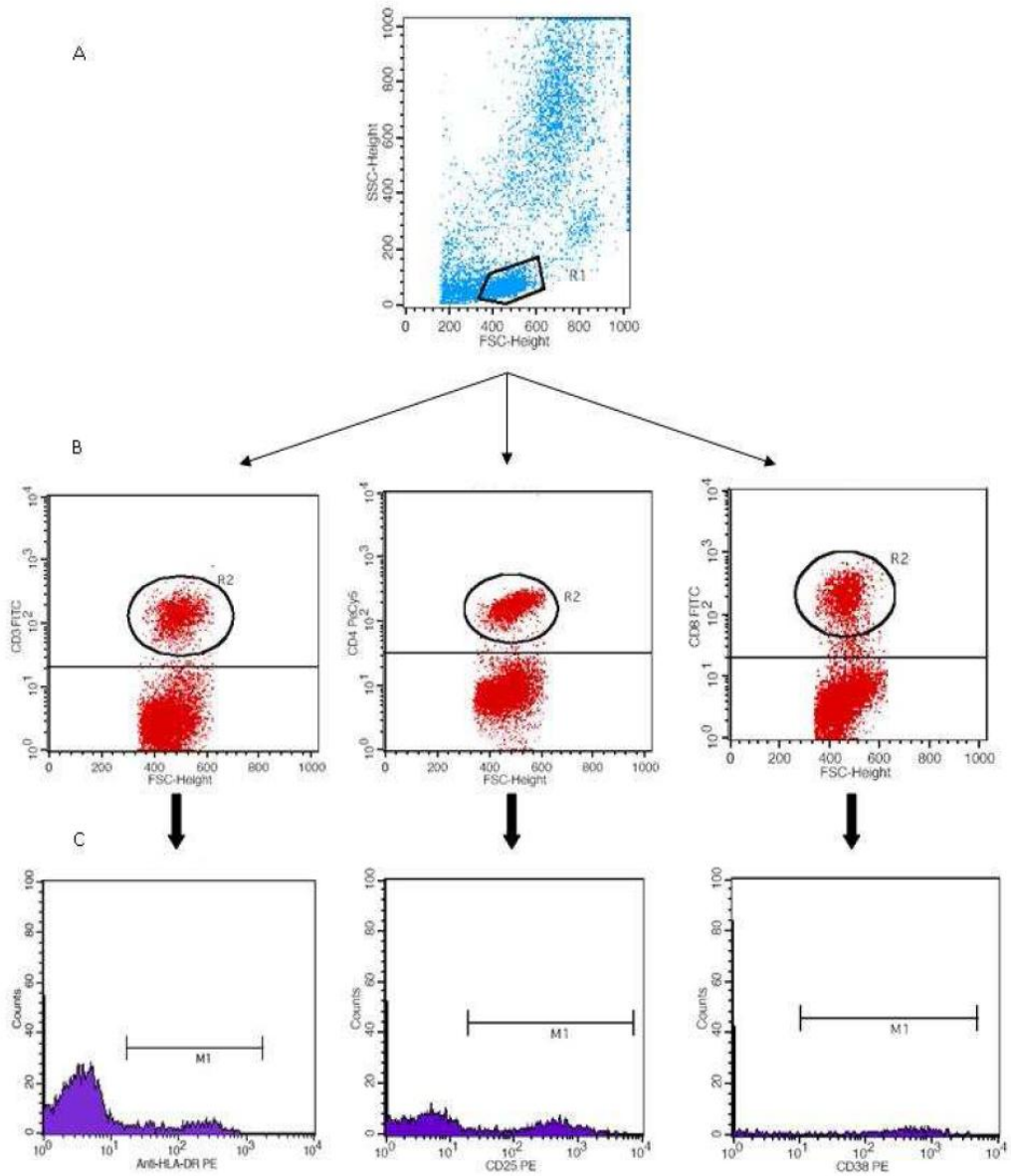
## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AMD-C JRS-O RVC PTB. Performed the experiments: JRS-O CRBL EGR. Analyzed the data: JRS-O EGR PTB AMD-C. Wrote the paper: JRS-O EGR AMD-C.

19. Cooke KR, Olkiewicz K, Erickson N, Ferrara JL (2002) The role of endotoxin and the innate immune response in the pathophysiology of acute graft versus host disease. *J Endotoxin Res* 8: 441–448.
20. Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T (2001) MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 414: 920–924.
21. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42: 145–151.
22. Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Mu W, Metz CN, et al. (1997) Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol* 150: 235–246.
23. Nishihira J, Mitsuyama K (2009) Overview of the role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 15: 2104–2109.
24. Ayoub S, Hickey MJ, Morand EF (2008) Mechanisms of disease: macrophage migration inhibitory factor in SLE, RA and atherosclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4: 98–105.
25. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, et al. (2000) Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* 6: 164–170.
26. Bozza FA, Gomes RN, Japiassú AM, Soares M, Castro-Faria-Neto HC, et al. (2004) Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock* 22: 309–313.
27. Yamada G, Shijubo N, Takagi-Takahashi Y, Nishihira J, Mizue Y, et al. (2002) Elevated levels of serum macrophage migration inhibitory factor in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Immunol* 104: 123–127.
28. Assunção-Miranda I, Amaral FA, Bozza FA, Fagundes CT, Sousa LP, et al. (2010) Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J* 24: 218–228.
29. Regis EG, Barreto-de-Souza V, Morgado MG, Bozza MT, Leng L, et al. (2010) Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the plasma of HIV-1-infected patients and in HIV-1-infected cell cultures: a relevant role on viral replication. *Virology* 399: 31–38.
30. Lieberman JM, Sacchetti J, Marks C, Marks WH (1997) Human intestinal fatty acid binding protein: report of an assay with studies in normal volunteers and intestinal ischemia. *Surgery* 121: 335–342.
31. Relja B, Szermutzky M, Henrich D, Maier M, de Haan JJ, et al. (2010) Intestinal-FABP and liver-FABP: novel markers for severe abdominal injury. *Acad Emerg Med* 17: 729–735.
32. Derikx JP, Vreugdenhil AC, Van den Neucker AM, Grootjans J, van Bijnen AA, et al. (2009) A pilot study on the noninvasive evaluation of intestinal damage in celiac disease using I-FABP and L-FABP. *J Clin Gastroenterol* 43: 727–733.
33. Barral-Neto M, Barral A, Santos SB, Carvalho EM, Badaró R, et al. (1991) Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. *J Immunol* 147: 281–284.
34. Soares NM, Ferraz TP, Nascimento EG, Carvalho EM, Pontes-de-Carvalho L (2006) The major circulating immunosuppressive activity in American visceral leishmaniasis patients is associated with a high-molecular weight fraction and is not mediated by IgG, IgG immune complexes or lipoproteins. *Microb Pathog* 40: 254–260.
35. Nery Costa CH, Werneck GL, Lamounier D, Holanda TA, Aguiar GB, et al. (2010) Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? – a case control study. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 386–395.
36. Cenini P, Berhe N, Hailu A, McGinnes K, Frommel D (1993) Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. *J Infect Dis* 168: 986–993.
37. Hailu A, van Baarle D, Knol GJ, Berhe N, Miedema F, et al. (2005) T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and

- asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. Clin Immunol 117: 182–191.
38. Benito JM, Zabay JM, Gil J, Bermejo M, Escudero A, et al. (1997) 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 14: 128–135.
  39. Galandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R (1994) The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. J Exp Med 179: 1895–1902.
  40. Bozza FA, Salluh JL, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, et al. (2007) Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. Crit Care 11: R49.
  41. Barral-Netto M, Badaró R, Barral A, Almeida RP, Santos SB, et al. (1991) Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. J Infect Dis 163: 853–857.
  42. Sundar S, Reed SG, Sharma S, Mehrotra A, Murray HW (1997) Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 56: 522–525.
  43. Calandra T, Roger T (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. Nat Rev Immunol 3: 791–800.
  44. Muigai R, Gatei DG, Shaunak S, Wozniak A, Bryceson AD (1983) Jejunal function and pathology in visceral Leishmaniasis. Lancet 2: 476–479.
  45. Baba CS, Makharia GK, Mathur P, Ray R, Gupta SD, et al. (2006) Chronic diarrhea and malabsorption caused by *Leishmania donovani*. Indian J Gastroenterol 25: 309–310.
  46. Hicks L, Kant P, Tay PH, Vincini V, Schuster H, et al. (2009) Visceral leishmaniasis presenting with intestinal failure: a case report and literature review. Eur J Gastroenterol Hepatol 21: 117–122.

# Supporting information – S1



#### Artigo 4 (submetido)

**Título:** Robust proinflammatory response in treated visceral leishmaniasis patients co-infected with HIV-1 may be due to microbial translocation.

**Autores:** Joanna R Santos-Oliveira, Eduardo G Regis, Joanna G. Valverde, Carmem BW Giacoia-Gripp, Priscilla Alexandrino-de-Oliveira, Jose Ângelo L Lindoso, Hiro Goto, Manoel P Oliveira-Neto, Jorge Guerra, Beatriz Grinsztejn, Selma Maria B. Jerônimo, Mariza G Morgado, Alda M Da-Cruz

**Revista na qual o artigo se encontra submetido:** Journal of Infectious Diseases

#### RESUMO

**Introdução:** A infecção por *Leishmania* foi considerada um cofator para a aumentada ativação celular em pacientes com leishmaniose visceral americana coinfectados com HIV-1/AIDS, (LVA/HIV-1) independente dos números de células T CD4<sup>+</sup> e da carga viral. Dessa maneira, nós hipotetizamos que a persistência de uma elevada carga parasitária apesar da terapia anti-*Leishmania* poderia ser responsável pela continuada estimulação imune.

**Métodos:** Este estudo transversal incluiu 14 sujeitos saudáveis (HS), 17 pacientes de LVA/HIV-1 e 16 pacientes infectados pelo HIV-1. As contagens de T CD4<sup>+</sup> e o percentual de células T CD8<sup>+</sup> expressando CD38 foram analisados por citometria de fluxo. A carga parasitária circulante foi quantificada por PCR em tempo real. Os níveis de lipopolissacarídeo (LPS), CD14 solúvel (sCD14), fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) e proteína intestinal ligadora de ácido graxo (IFABP) foram quantificadas por ELISA. Os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β/IL-6/IL-8/IL-17/IFN-γ/TNF-α) foram avaliados pela análise multiplex.

**Resultados e Conclusões:** Os menores níveis de parasitemia foram observados após o tratamento anti-*Leishmania* ( $p < 0,05$ ) e sob terapia antiretroviral (ART). Entretanto, níveis mais elevados de células CD38<sup>+</sup> em T CD8<sup>+</sup> foram observadas em ambas as fases clínicas da leishmaniose comparadas aos casos de HIV-1/AIDS ( $p < 0,05$ ). Os níveis de citocinas pró-inflamatórias estavam significativamente aumentados tanto nos casos coinfectados ativos, quanto nos casos em remissão clínica. Os níveis de LPS se correlacionaram com os níveis de IFABP ( $r = 0,45$ ;  $p < 0,05$ ). A análise estatística multivariada mostrou que os níveis de LPS estavam positivamente correlacionados com o percentual de células CD38<sup>+</sup> em T CD8<sup>+</sup> ( $p < 0,001$ ) independente das outras variáveis confundidoras. A infecção por *Leishmania* também estava com os níveis de ativação celular ( $p < 0,001$ ). Finalmente, LPS e infecção por *Leishmania* se correlacionaram positivamente com os níveis das citocinas IL-6 e IL-8 ( $p < 0,01$ ). Os níveis de LPS ao lado das consequências imunológicas da infecção por *Leishmania* foram associados com os níveis de ativação celular em pacientes coinfectados. Entretanto, esses cofatores parecem contribuir para o status de ativação das células promovendo um intenso ambiente inflamatório (*cytokine storm*) e não um aumento da carga parasitária, uma vez que o número de cópias de DNA da *Leishmania* foi baixo, mesmo após o tratamento específico e ART. A quimioprofilaxia secundária para a leishmaniose ou mesmo o uso de drogas anti-inflamatórias, ou antibióticos contra bactérias gram-negativas pode melhorar o prognóstico de pacientes de LVA/HIV-1.

**Robust proinflammatory response in treated visceral leishmaniasis patients co-infected with HIV-1 may be due to microbial translocation.**

Joanna R Santos-Oliveira<sup>1</sup>, Eduardo G Regis<sup>2</sup>, Carmem BW Giacoia-Gripp<sup>3</sup>, Joanna G. Valverde<sup>4</sup>, Priscilla Alexandrino-de-Oliveira<sup>5</sup>, Jose Ângelo L Lindoso<sup>6</sup>, Hiro Goto<sup>6</sup>, Manoel P Oliveira-Neto<sup>7</sup>, Jorge Guerra<sup>8</sup>, Beatriz Grinsztejn<sup>7</sup>, Selma Maria B. Jerônimo<sup>4</sup>, Mariza G Morgado<sup>3</sup>, Alda M Da-Cruz<sup>1,9</sup>

Running title: LPS-induced cytokine storm in *Leishmania*/HIV-1-AIDS co-infection

Author affiliations:

<sup>1</sup> Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. CEP 21040-360, Tel 00.55.21.3865-8147, Fax 00.55.21.2290-0479.

<sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa sobre o Timo, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, Brazil. CEP 21040-360, Tel 00.55.21.2562-1248, Fax 00.55.21.2290-0479.

<sup>3</sup> Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. CEP 21040-360 Tel 00.55.21.3865-8106, Fax. 00.55.21.2290-0479.

<sup>4</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil. CEP 59072-970, Tel 00.55.84.3215-3428, Fax: 00.55.84.3215-3428.



<sup>5</sup> Hospital-Dia Prof<sup>ª</sup> Esterina Corsini, Hospital Universitário, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS, Mato Grosso do Sul, Brazil. CEP 79070-900 Tel 00.55.67.3345-3135 Fax. 00.55.67.3345-3651.

<sup>6</sup> Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. CEP 05403-010 Tel. 00.55.11.3066.7023 Fax. 00.55.11. 3062.3622.

<sup>7</sup> Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, IPEC – FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, Brazil. CEP 21040-360 Tel 00.55.21.3865-9545, Fax. 00.55.21.2564-4933.

<sup>8</sup> Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil. CEP 69040-000, Tel 00.55.92.2127-3446, Fax: 00.55.92.2127-3446.

<sup>9</sup> Disciplina de Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas-Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. CEP 20551-030, Tel. 00.55.21.2868-8048.

Corresponding author: Alda Maria Da-Cruz, Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. CEP 21040-360, Tel 00.55.21.3865-8109, Fax 00.55.21.2290-0479, e-mail: [alda@ioc.fiocruz.br](mailto:alda@ioc.fiocruz.br)

## ABSTRACT

**Background:** *Leishmania* infection was considered to be a co-factor in the heightened cellular activation observed in American visceral leishmaniasis-HIV-1/AIDS patients (AVL/HIV-1), independent of CD4<sup>+</sup> T cell numbers and viral load. Thus, we hypothesized that the persistence of a high parasite load despite anti-leishmanial therapy could be responsible for the continued immune stimulation.

**Methods:** This cross-sectional study included 14 healthy subjects (HS), 17 AVL/HIV-1 patients and 16 HIV-1/AIDS patients. The percentage of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD38 were analyzed by flow cytometry. Blood parasite load was quantified by real-time PCR. Levels of lipopolysaccharide (LPS), soluble CD14, macrophage migration inhibitory factor (MIF) and intestinal fatty acid-binding protein (IFABP) were quantified by ELISA. Plasma levels of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ /IL-6/IL-8/IL-17/IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ ) were assessed by multiplex analysis.

**Results:** Lower *Leishmania* parasitemia were observed after anti-leishmanial treatment and antiretroviral therapy (ART) use ( $p < 0.05$ ). However, higher levels of CD38-positive cells on CD8 T were observed in both clinical phases of leishmaniasis compared with HIV-1/AIDS cases ( $p < 0.05$ ). AVL/HIV-1 and HIV-1 patients showed higher levels of LPS and IFABP than HS ( $p < 0.001$ ). Proinflammatory cytokine levels were significantly augmented in active co-infected cases as well as in the remission phase. LPS levels were positively correlated with IFABP levels ( $r = 0.45$ ;  $p < 0.05$ ). A multivariate statistical analysis showed that LPS levels were positively correlated with CD38 on CD8<sup>+</sup> T cells ( $p < 0.001$ ) independent of other confounding variables. *Leishmania* infection was also associated with cellular activation levels ( $p < 0.001$ ). Finally, LPS and *Leishmania* infection were positively correlated with IL-6 ( $p < 0.05$ ) and IL-8 ( $p < 0.01$ ) levels.

**Conclusions:** LPS levels along with the immune consequences of *Leishmania* infection were associated with elevated cellular activation in co-infected patients. However, these co-factors appeared to contribute to the activation status of cells by promoting a cytokine storm and not *via* parasite burden, as low levels of *Leishmania* DNA were observed after specific treatment and ART use. Secondary chemoprophylaxis for leishmaniasis or even the use of anti-inflammatory drugs or antibiotics against gram-negative bacteria may improve the prognosis of AVL/HIV-1 patients.

**Key words** visceral leishmaniasis-HIV-1/AIDS co-infection, microbial translocation, inflammatory cytokines.



## INTRODUCTION

*Leishmania*/HIV-1 co-infection is considered to be an emerging public health problem and has been found with increasing frequency in several regions worldwide, mainly due to greater geographical overlap between these two diseases. The majority of reported cases of visceral leishmaniasis-associated HIV-1 infection are from the Mediterranean basin [1], but Brazil accounts for most of the cases in the Americas. From 2001 to 2008, approximately 1.5-2% of confirmed American visceral leishmaniasis cases (AVL) were HIV-1 co-infected [2,3], thereby confirming that HIV-1 infection enhances the risk of developing AVL in endemic areas and vice versa [1,3].

The immunologic pathologies resulting from AVL and HIV-AIDS both reciprocally affect the outcome of both infections and may result in more severe disease. The impairment of the immune system caused by HIV-1 and the depletion of specific lymphocyte subsets compromise the immune mechanisms that are involved in parasite control in AVL co-infected patients [4,5], leading to increased parasite load, drug resistance and frequent relapses [1,6,7]. Similarly, *Leishmania* infection can contribute to a more rapid progression to AIDS by either increasing the plasma viral load [8,9] or enhancing chronic immune activation through stimulation by parasite antigens [10,11]. The reduction in the number of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes due to AVL [12,13] further contributes to the lymphocyte depletion that already occurs in HIV-1 infection [14]. Importantly, these low CD4<sup>+</sup> T cell counts (under 200 cells/mm<sup>3</sup>) were observed to be maintained during the clinical remission of VL/HIV-AIDS patients despite antiretroviral therapy (ART) and satisfactory anti-leishmanial therapy [15].

Chronic immune activation is a hallmark of HIV-1 infection and has been considered to be a stronger predictor of disease progression than plasma viral load [16,17]. Persistent immune activation and progression to AIDS are linked to the enhanced transcription of the integrated virus that then infects new targets, increased T cell proliferation and subsequent cell death induced by the activation of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell memory populations, resulting in an exhaustion of immune resources [18,19]. High levels of proinflammatory cytokines in the serum can also contribute to this activated status [18]. Antigenic stimulation as a consequence of other infections, such as tuberculosis [20], CMV [21] and hepatitis B and C [22,23], constitutes another cause of HIV-associated immune activation.

Recently, our group reported high levels of cellular activation and low CD4<sup>+</sup> T cell counts in AVL/HIV-1 patients in remission despite anti-*Leishmania* therapy and undetectable or low levels of viral load. *Leishmania* infection was thought to be the co-factor responsible for the enhanced cellular activation status observed in HIV co-infected patients [11], especially in patients with the visceral form of the disease. This finding suggests the inefficient control of the parasite after anti-leishmanial therapy, which may justify the use of secondary prophylaxis [7].

Another potential mechanism associated with chronic immune activation is mediated by gut microbial products [24]. The massive depletion of memory CD4<sup>+</sup> T cells in mucosal lymphoid tissue during acute HIV-1 infection results in disruption of the anatomofunctional gastrointestinal barrier, enabling the translocation of luminal microbiota into the circulation [25,26]. Microbial translocation has already been observed in other conditions not related to infectious diseases, such as inflammatory bowel disease [27], graft versus host disease [28] and idiopathic CD4 lymphocytopenia [29]. Mucosal invasion by leishmanial amastigotes and the systemic lymphocyte depletion observed in AVL patients [12,30,31] could constitute the immunopathogenic basis for the lipopolysaccharide (LPS)-related activation of lymphocytes and release of proinflammatory cytokines [32]. In this scenario, an overlap in cellular activation due to infections with both HIV-1 and *Leishmania* would enhance the proinflammatory state, thereby worsening the effector response and the subsequent clinical outcome of co-infected patients [32-34].

Previous results have shown that during clinical remission, the activation of the immune system is enhanced in *Leishmania*/HIV-1 co-infected patients despite anti-leishmanial treatment and ART. However, the mechanism responsible for this maintenance of immune activation is not clear. Considering that *Leishmania* infection has been suggested to be the co-factor responsible for the heightened cellular activation independent of CD4<sup>+</sup> T cell numbers and viral load [11], we hypothesized that the persistence of a high parasitic load despite anti-leishmanial therapy could be responsible for the continued immune stimulation.

## MATERIALS AND METHODS

### Recruitment of patients and healthy subjects

Our cross-sectional study included seventeen AVL/HIV-1 co-infected patients (AVL/HIV-AIDS). Twelve patients had active disease without previous anti-leishmanial therapy. Nine patients were in the remission phase for at least six months after the end of anti-leishmanial treatment and had no signs or symptoms of active leishmaniasis. Four of the patients were evaluated in the two phases of the disease. AVL diagnosis was confirmed by the visualization of amastigotes in Giemsa-stained bone marrow smears. Patients were treated for AVL according to Brazilian guidelines [35]. Ten visceral leishmaniasis patients who participated in a previous study [32] were used as controls in the present study. All laboratorial and immunological parameters measured in this study were compared with these AVL mono-infected patients and showed significant differences (Supplementary table).

Sixteen HIV-1/AIDS cases without previous leishmaniasis were enrolled in the study and paired with co-infected patients by viral load (HIV RNA copies/mL: < 400, > 400 to 10,000 and > 10,000). All AVL-associated HIV-1/AIDS and HIV-1/AIDS patients received antiretroviral therapy for at least one year according to Brazilian guidelines [36]. Fourteen volunteers without leishmaniasis or HIV-1/AIDS were included as healthy subjects (HS). Written informed consent was obtained from all participants. The study was approved by the Fundação Oswaldo Cruz and IPEC Ethical Committees.

### Immunologic and virologic assessments

To determine the absolute counts of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, BD Tritest® monoclonal antibodies specific for CD4, CD8 and CD3 conjugated to FITC, PE and PerCP, respectively, were used with a BDTrue Count® reagent kit according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Samples were acquired using a FACSCalibur® and analyzed with Multiset® software (BD, USA). The results were expressed as the number of cells/mm<sup>3</sup>.

Plasma HIV-1 RNA levels were quantified using a branched DNA assay (Siemens, Versant HIV-1 RNA 3.0, Tarrytown, NY, USA). The lower limit of detection for this assay was 50 copies/mL.

## Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and lymphocyte activation

To evaluate lymphocyte activation, PBMCs were obtained as described elsewhere [11]. Briefly, PBMCs were separated over a Ficoll-Hypaque gradient (Histopaque 1077; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) and labeled with anti-CD8 FITC and anti-CD38 PE monoclonal antibodies (BD Simultest™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Fixed cells were acquired (at least 10,000 events) on a FACSCalibur and analyzed with CellQuest software (BD Biosciences, USA). The analysis region was established by first gating on the CD3<sup>+</sup> T lymphocytes. The results were expressed as the percentage of CD38-positive cells of the total CD8<sup>high</sup> T cells.

## Quantification of lipopolysaccharide (LPS), soluble CD14 (sCD14) and intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) plasma levels

Plasma samples were collected after the centrifugation of heparinized venous blood and aliquoted and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysis. The samples were diluted in endotoxin-free water, and plasma LPS levels were quantified using a commercial assay kit (Limulus amoebocyte lysate QCL-1000; Cambrex, Milan, Italy) according to the manufacturer's protocol. The results were expressed as pg/mL, and the sensitivity level was 10 pg/mL. Soluble CD14 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (sCD14 Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); the results were expressed as ng/mL, and the minimum detection limit was 125 pg/mL. Plasma intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) levels were determined using a commercial ELISA kit (Duo Set; R&D Systems, USA). The results were expressed as pg/mL, and the minimum detection limit was 31.2 pg/mL.

## Cytokine measurement

A multiplex biometric immunoassay containing fluorescently labeled microbeads was used for plasma cytokine measurement (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The following cytokines were quantified: IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17 and MIP-1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ ). Cytokine levels were calculated with Luminex technology (Bio-Plex Workstation; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Data analysis was performed using the software provided by the manufacturer (Bio-Rad

Laboratories, USA). A range of 0.51–8,000 pg/mL of the recombinant cytokines was used to establish the standard curves and sensitivity of the assay.

Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) were measured using a commercial ELISA kit (Duo Set; R&D Systems, USA), and the results were expressed as pg/mL; the minimum detection level was 31.2 pg/mL.

Quantification of the *Leishmania (Leishmania) infantum mag-1* gene in blood samples by real time PCR

Blood samples were collected in EDTA tubes. DNA extraction was performed using a DNeasy® blood and tissue kit and spin-column protocol (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA was isolated from 200 µL of blood and eluted with 100 µL of elution buffer. DNA concentrations and enrichment relative to protein in all of the samples were determined at 260/280 nm with a spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), and DNA was stored at –70°C until use.

A real-time PCR assay based on the TaqMan system was used for the accurate quantification of *Leishmania infantum* DNA in biological samples. Considering the nuclear genome, MAG-1 (major surface protease-associated gene) was chosen as the molecular target. The MAG-1 primers sets used in this assay, as well as, the procedure were performed according to a previously described protocol in Weirather et al (2011) [37]. MAG-1 is specific since it was earlier designed against *mag* gene sequences only known to be present in *Leishmania (L.) infantum* [38]. Briefly, specific primers based on MAG-1 consisted of 3.75 pmol of forward primer (AGAGCGTGCCTTGGATTGTG), 3.75 pmol of reverse primer (CGCTGCGTTGATTGCGTTG) and 2.5 pmol of TaqMan probe (FAMT-GCGCACTGCACTGTCGCCCC-TAMRA). The assay was performed in a 10 µL final volume with 4 µL of sample DNA. Absolute quantification was determined by comparison with a standard curve constructed using a 10-fold serially diluted sample of *L. infantum* parasite DNA, corresponding to  $10^6$  to  $10^3$  parasites per reaction tube. This parasite was recovered from a patient with visceral leishmaniasis and was properly characterized as *Leishmania (Leishmania) infantum* (IOC563).

The same working conditions described above were used for kinetoplast DNA (kDNA) minicircles amplification [37]. Primers and probes were –AATGGGTGCAGAAAT CCGTTC (3.75 pmol), CCACCACCCGGCCCTATTTTAC (3.75 pmol) and FAM-CCCCAGTTTCCCGCCCCGGA-TAMRA (2.5 pmol). Amplification and detection were performed using an ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Standards, samples and negative controls were analyzed in triplicate for each run. The cycling parameters were 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The results were expressed as parasitic forms per mL (PF/mL) of blood. The sensitivity of the real time PCR for MAG-1 was 0.1 parasite per mL.

#### Statistical analysis

The Mann-Whitney U test, Spearman's test and Kruskal-Wallis test were performed using GraphPad Prism software, version 5.0 (San Diego, CA, USA). The values were expressed as medians and interquartile ranges. A multivariate statistical analysis was performed through multiple linear regression (SPSS software, version 9.0) to determine the influence of intervening variables on the percentage of CD38-positive cells of the total CD8<sup>high</sup> T cells (dependent variable). Absolute numbers of CD4<sup>+</sup> T cells, viral load (absolute levels in copies/mL), leishmaniasis (presence or absence) and LPS, sCD14, I-FABP and MIF levels were considered as independent variables. The influence of intervenient factors, such as parasite load, LPS, viral load and presence or absence of leishmaniasis, on the levels of pro-inflammatory cytokines, including IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17, MIP-1 $\beta$  and MIF, was also assessed.

## RESULTS

Previous results have shown that AVL/HIV-AIDS cases evaluated after anti-leishmanial therapy demonstrated enhanced levels of cellular activation [11]. In the present paper, we found that during active disease, the percentage of CD38-positive cells on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was already elevated in AVL/HIV-AIDS patients (82.5% [75.7%-90.1%]). In

addition, this percentage was as high as the remission phase of leishmaniasis (93.5% [87%-97.9%], Figure 1A). The cellular activation status in the group of AVL/HIV-AIDS patients was higher compared with the HIV-AIDS cases (55.8% [49%-64%]). As expected, the lowest levels of cellular activation were found in HS (30.7% [28.6%-34%]).

The presence of *Leishmania* infection and not HIV viral load was considered to be the co-factor that led to the heightened activation levels observed in anti-leishmania-treated co-infected patients [11]. In the present study, we investigated whether the elevated parasite load was responsible for the maintenance of immune stimulation. Co-infected patients had much higher parasite loads during active disease (53,356 PF/mL [34,913 PF/mL – 108,786 PF/mL]) compared with co-infected patients in the remission phase (1.2 PF/mL [1 PF/mL – 22,640 PF/mL,  $p < 0.05$ ], Figure 1B). These results indicate that anti-leishmanial therapy was successful in reducing the number of circulating parasites. As expected, the parasite levels in the co-infected patients were higher than the AVL mono-infected patients in both clinical phases (active: 2,856 PF/mL [1,440 PF/mL – 15,350 PF/mL], remission: 1.2 PF/mL [1 PF/mL - 400 PF/mL]). The parasite load was positively correlated with the percentage of CD38 expression on CD8<sup>+</sup> T cells in the active AVL/HIV-AIDS patients ( $r = 0.60$ ,  $p < 0.05$ , Figure 1C). Surprisingly, no correlation was observed in the remission phase, as high levels of activation were observed despite the lower parasite load (Figure 1D). Parasite load was also quantified with primers targeting kinetoplast DNA (kDNA) minicircles [37]. Because kDNA contains thousands of DNA minicircles encoding genes, parasite load levels were more elevated in all of the groups evaluated (data not shown). However, similarly to what was found to MAG-1, active AVL/HIV-AIDS co-infected patients showed the highest kDNA copy numbers, whereas in remission phase, it were significantly lower (active: 132,000 PF/mL [25,000 PF/mL – 288,000 PF/mL], remission: 178 PF/mL [62 PF/mL – 18,000 PF/mL]). Thus, we conclude that having leishmaniasis with its associated pathological damage is a background factor for the observed enhanced cellular activation and such activation may not be directly associated with the presence of the parasite itself.

Because the majority of AVL/HIV-AIDS patients had undetectable or low viral loads and reduced parasitemia (Supplementary Table) after therapy, we further investigated whether LPS originating from microbial translocation could be influencing T-cell activation [24,32]. Active AVL-associated HIV-1/AIDS patients had much higher median levels of

LPS (52 pg/mL [49.5 pg/mL – 57.7 pg/mL] than HS (26 pg/mL [14 pg/mL – 29 pg/mL],  $p < 0.001$ ). However, the levels were similar to those observed in HIV-AIDS patients (50.6 pg/mL [45.7 pg/mL – 53 pg/mL]) (Figure 2A).

Enhanced circulating levels of sCD14 were observed in active co-infected patients compared with HIV-AIDS patients, and the difference was more pronounced when co-infected patients were compared with HS (Figure 2B and Supplementary Table). A positive correlation was detected between LPS and sCD14 ( $r = 0.40$ ;  $p < 0.05$ ), indicating that sCD14 was released by LPS-stimulated innate immune cells (Figure 2C).

Interestingly, LPS and sCD14 levels were still elevated during the remission phase, and the levels were similar to those observed in active co-infected patients (Figure 2A and B).

Gut damage has been implicated in the increased intestinal permeability and microbial translocation into the circulation [25,26,39]. Because microbial translocation could also occur in AVL [32], we evaluated whether the *Leishmania*-HIV-1 association could lead to enhanced enterocyte damage. AVL/HIV-AIDS patients showed augmented levels of I-FABP, but these levels were not different from HIV-AIDS cases (Figure 2D). All of the groups presented significantly higher I-FABP levels than HS ( $p < 0.001$ ). Upon examination of all of the patients infected with HIV-1, a positive correlation was verified between IFABP and LPS levels ( $r = 0.40$ ;  $p < 0.05$ ), suggesting the occurrence of intestinal damage (Figure 2E).

To some extent, these results indicate that tissue damage is an indirect key factor in the ongoing T cell activation observed in AVL/HIV-AIDS patients, even after anti-leishmanial therapy. Another consequence of this immune-activated status is a large release of inflammatory cytokines.

MIF is a proinflammatory cytokine that is released in response to many stimuli, including endotoxemia (i.e., LPS). In comparison with HS ( $p < 0.001$ ), AVL/HIV-AIDS (active and remission phase) and HIV-AIDS patients showed significantly higher levels of MIF, although no significant difference was found between co-infected and HIV-1/AIDS patients (Figure 2F).

To determine which factors were associated with the high activation levels observed in the co-infected patients, a multivariate statistical analysis was performed through multiple



linear regression. The model showed that the presence of *Leishmania* infection influenced T-cell activation ( $p < 0.001$ ). Additionally, we observed a significant positive correlation between LPS and CD38 expression on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes ( $p < 0.001$ ) after controlling for CD4<sup>+</sup> T cell counts, HIV viremia and sCD14, I-FABP and MIF levels (Table 1). Parasite load could not be included as a variable because it was not present in all three patient groups evaluated (Table 1).

Another well-described outcome of immune activation in both HIV/AIDS and VL patients is the secretion of proinflammatory molecules [13,18]. Moreover, LPS is also known for its potent immunostimulatory activity through TLR-4 stimulation, leading to the production of a variety of proinflammatory cytokines [40]. To investigate a possible synergism in the proinflammatory response induced in the co-infected patients, a multiplex cytokine assay was performed. Similar to T-cell activation, the plasma levels of proinflammatory cytokines were also highly elevated in co-infected patients compared with HIV/AIDS patients and HS (Table 2). Coinfected patients showed significantly higher median serum levels of all of the inflammatory cytokines than the HIV/AIDS or VL mono-infected cases alone (Table 2).

The factors underlying this cytokine storm in co-infected patients were also analyzed (Table 3). For such an analysis, each cytokine was considered to be a dependent variable (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17, MIP-1 $\beta$  and MIF), and viral load, LPS, sCD14 levels and *Leishmania* infection (presence or absence of leishmaniasis disease, but not parasite load) were considered to be independent variables. In this analysis, we verified that LPS levels were positively correlated with IL-6 and IL-8 levels (Table 3). Soluble CD14 levels were positively correlated with IL-8 and negatively correlated with MIP-1 $\beta$  levels. Moreover, *Leishmania* infection was positively correlated with levels of TNF, IL-6, IL-8, IL-17 and MIP-1 $\beta$ . Taken together, these data suggest that an activated and inflammatory state can indeed be observed in AVL/HIV-AIDS co-infected patients.

## **Discussion**

A previous study demonstrated that AVL/HIV-AIDS co-infected patients have enhanced cellular activation levels, even under antiretroviral therapy and after anti-leishmanial

treatment. *Leishmania* infection was the co-factor associated with the percentage of CD38 on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes independent of CD4<sup>+</sup> T cells counts and viral load [11]. In the present study, we first investigated whether the persistence of *Leishmania* parasites after therapy could explain the activated phenotype observed in treated co-infected patients.

In this paper, both active AVL/HIV-AIDS patients and those in remission had high percentages of CD38 on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, indicating that co-infected patients have an increased cellular activation status independent of the clinical phase of leishmaniasis, ART use or even anti-leishmanial treatment. Interestingly, the majority of AVL/HIV-AIDS patients in remission showed lower parasite loads than patients in the active phase. Blood parasite clearance in treated co-infected patients appeared to be as effective as in treated AVL patients without HIV/AIDS, as similar median values of parasite loads were detected between the two groups of patients (MAG-1 copy numbers were undetectable in five AVL/HIV-AIDS and in three AVL patients). On first glance, this result suggests that anti-leishmanial therapy was successful in reducing the parasite load, despite HIV-1 infection and poor immune reconstitution (Supplementary Table). However, the patients in remission did not completely clear *Leishmania* kDNA from the blood, and the kDNA remained detectable by real-time PCR even after six months of anti-leishmanial treatment (data not shown). This result is in accordance with similar studies in a cohort of treated coinfecting patients in the Mediterranean, thus reinforcing the notion that AVL/HIV patients take longer to achieve *Leishmania* PCR negativity after specific therapy [41]. However, despite successful treatment, *Leishmania* may remain in the bone marrow, and this can explain the return of parasite replication and the frequent reactivation episodes of the disease [6,7,41]. Herein, although parasite antigens cannot be ruled out as an important factor driving cellular activation in AVL/HIV-AIDS patients, we did not observe a positive correlation between parasite load and the percentage of CD38 on CD8<sup>+</sup> T cells in co-infected patients in remission. Such a correlation was only observed for active AVL/HIV-AIDS patients.

In addition to leishmanial antigens [13], LPS has been implicated in T-cell activation in VL patients [32]. Considering that LPS also plays an important role in HIV-1 pathogenesis [24], we expected that this microbial product would be a more relevant factor in maintaining the activation status in co-infected patients. Increased LPS levels were found in both active and treated AVL/HIV-AIDS patients, which is consistent with their

augmented cellular activation status. Additionally, the positive correlation between LPS and IFABP supports the hypothesis that this microbial product originates in the lumen, as IFABP is released after enterocyte damage [23,42]. However, LPS levels were similar between co-infected and HIV-AIDS cases, suggesting that HIV-1 infection itself is such a potent inducer of microbial translocation that LPS levels in VL patients harboring this virus are already at a threshold.

After adjusting for confounding variables, such as CD4<sup>+</sup> T cell counts, HIV-1 viral load and sCD14, I-FABP and MIF levels, by multivariate regression analysis, LPS levels and the presence of *Leishmania* infection were the factors that were significantly associated with T cell activation. In contrast, parasite load was not correlated with the high percentage of CD38 on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in a bivariate analysis, most likely because the parasite burden was lower after therapy in comparison with active patients. No association was detected even when co-infected patients were matched by viral load in a multivariate analysis (data not shown). Thus, we reasoned that the variable “*Leishmania* infection” discriminated the presence or absence of the disease (visceral leishmaniasis) together with its immunopathological disorders.

Macrophages/monocytes and dendritic cells, in addition to being the host cells harboring *Leishmania* amastigotes, are also potent producers of proinflammatory cytokines upon Toll-like receptor 4 activation by LPS [43]. In our study, we demonstrated an enhanced inflammatory cytokine milieu in AVL/HIV-AIDS patients independent of the clinical phase of leishmaniasis, as serum levels were still elevated after anti-leishmanial treatment. In addition, these levels were much higher compared with those observed in HIV/AIDS [44] or VL mono-infected cases [32-34]. The data suggest that although LPS levels had reached a plateau, the immunostimulatory functions of LPS-induced cytokines or even the remaining leishmanial antigens may contribute to the complex pathologic environment found in these patients. In accordance with our results, a previous study also described higher levels of TNF and IFN- $\gamma$  in AVL-HIV co-infected patients in comparison with HIV<sup>+</sup> and VL<sup>+</sup> controls. More importantly, these levels remained elevated five months after anti-leishmanial treatment and ART use [45]. Thus, as proposed for HIV-positive patients [46], the augmented TNF levels observed in our co-infected patients could contribute to microbial translocation by disrupting mucosal barrier integrity. Moreover, the high intestinal leishmanial parasitemia [47,48] and frequent diarrheal episodes in

AVL/HIV-AIDS patients can be key factors in aggravating intestinal permeability. Our results indicate that the cytokine network induced by the *Leishmania*/HIV-1 association differs from mono-infections and suggest an *in vivo* synergistic effect in co-infected patients.

An analysis of the factors that could be associated with this cytokine storm revealed that LPS was positively correlated with IL-6 and IL-8, which were most likely produced by LPS-stimulated innate cells. Although the cytokine MIF is involved in IL-6 and IL-8 production after LPS stimulation [49], no correlation between MIF and LPS was verified in this study. In co-infected patients, the presence of *Leishmania* infection was also positively correlated with not only IL-6 and IL-8 but also TNF, IL-17 and MIP-1 $\beta$ . Thus, AVL/HIV co-infection results in much higher levels of plasma inflammatory cytokines, which in turn can contribute to the vicious cycle of persistent immune activation [18,19,40].

In summary, the results of this study suggest that LPS levels along with the immune consequences of leishmaniasis ("*Leishmania* infection" variable) are associated with high levels of cellular activation in co-infected patients. However, these co-factors appear to contribute to cellular activation by enhancing the plasma cytokine storm, not *via* parasite burden, as low levels of *Leishmania* kDNA were observed after specific treatment and ART use. Further studies with larger groups of patients could reveal more about the intricate host, *Leishmania* and HIV-1 dynamics and support the hypothesis that opportunistic infections in general may trigger the secretion of proinflammatory cytokines that enhance T-cell activation.

Taken together, we speculate that the translocation of microbial products may have more severe consequences in AVL/HIV-AIDS patients resulting in potentiated plasma levels of inflammatory cytokines, which may promote and refuel cellular activation. Because persistent T-cell activation may prevent immune reconstitution and culminate in the exhaustion of immune resources, further studies will be necessary. A prospective study design is currently in progress, and the results will be essential to not only validate the data described here but also investigate the consequences to the functionality of T cells with respect to the memory compartment, senescence and the antigen-specific cytokines produced. These results may offer a rational basis for the introduction of secondary

chemoprophylaxis for leishmaniasis or even the use of anti-inflammatory drugs or antibiotics against gram-negative bacteria.

#### Funding

This work was supported by the Programa Nacional de DST/AIDS, Ministério da Saúde (grant ED00095/2007) and Instituto Oswaldo Cruz (internal funds). JRSO receive a fellowship from FAPERJ (FAPERJ nota 10). AMC receive a research fellowship from CNPq and FAPERJ.

#### Acknowledgments

We would like to thank Dr. Beatriz Grinsztejn for careful review of the manuscript and suggestions. Thanks to Dr. P. Bozza for helpful discussions about multiplex results and EF Assis for laboratorial assistance with the multiplex assay. We also thank Dr. Felipe Carvalho-Costa for helpful discussions about multivariate analysis and assistance with statistical analysis.

## References

1. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* **2008**; 21:334-59.
2. Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol* **2003**; 97 Suppl 1:17-28.
3. Sousa-Gomes ML, Maia-Elkhoury AN, Pelissari DM, et al. Co-infection *Leishmania*/HIV in Brazil: Epidemiological, Clinical and Laboratorial Aspects. *Epidemiol Serv Saúde* **2011**; 20:519-26.
4. Wolday D, Akuffo H, Fessahaye G, et al. Live and killed human immunodeficiency virus type-1 increases the intracellular growth of *Leishmania donovani* in monocyte-derived cells. *Scand J Infect Dis* **1998**; 30:29-34.
5. Barreto de Souza V, Pacheco GJ, Silva AR, et al. 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**; 194:846-854.
6. Casado JL, Lopez-Velez R, Pintado V, et al. Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2001**; 20:202-5.
7. 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:e1153.
8. Zhao C, Papadopoulou B, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clin Immunol* **2004**; 113:81-88.
9. Mock DJ, Hollenbaugh JA, Daddacha W, et al. Induces Survival, Proliferation and Elevated Cellular dNTP Levels in Human Monocytes Promoting Acceleration of HIV Co-Infection. *PLoS Pathog* **2012**; 8:e1002635.
10. 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.
11. Santos-Oliveira JR, Giacoia-Gripp CB, Alexandrino de Oliveira P, et al. High levels of T lymphocyte activation in *Leishmania*-HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load. *BMC Infect Dis* **2010**; 10:35863.

12. Saha S, Mondal S, Banerjee A, et al. Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res* **2006**; 123:245-266.
13. Goto H, Prianti MG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **2009**; 51:241-246.
14. Sinha PK, Bimal S, Singh SK, et al. Pre- & post-treatment evaluation of immunological features in Indian visceral leishmaniasis (VL) patients with HIV co-infection. *Indian J Med Res* **2006**; 123:197-202.
15. Alexandrino-de-Oliveira P, Santos-Oliveira JR, Dorval ME, et al. HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2010**; 105:692-7.
16. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, et al. Elevated CD38 antigen expression on CD8<sup>+</sup> T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4<sup>+</sup> cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **1997**; 16:83-92.
17. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* **1999**; 179:859-70.
18. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* **2008**; 214:231-41.
19. Douek DC, Roederer M, Koup RA. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med* **2009**; 60:471-84.
20. Rodrigues DS, Cunha RM, Kallas EG, et al. Distribution of naive/effector CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and expression of CD38 on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in AIDS patients with tuberculosis. *Braz J Infect Dis* **2003**; 7:161-165.
21. Doisne JM, Urrutia A, Lacabartz-Porret C, et al. CD8<sup>+</sup> T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J Immunol* **2004**; 173:2410-8.
22. Gonzalez VD, Falconer K, Blom KG, et al. High levels of chronic immune activation in the T-cell compartments of patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 and on highly active antiretroviral therapy are reverted by alpha interferon and ribavirin treatment. *J Virol* **2009**; 83:11407-11411.

23. Sandler NG, Koh C, Roque A, et al. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology* **2011**; 141:1220-30, 1230.e1-3.
24. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* **2006**; 12:1365-71.
25. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **2004**; 200:761-70.
26. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, et al. CD4<sup>+</sup> T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **2004**; 200:749-59.
27. Caradonna L, Amati L, Magrone T, et al. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res* **2000**; 6:205-14.
28. Cooke KR, Olkiewicz K, Erickson N, et al. The role of endotoxin and the innate immune response in the pathophysiology of acute graft versus host disease. *J Endotoxin Res* **2002**; 8:441-8
29. Lee PI, Ciccone EJ, Read SW, et al. Evidence for translocation of microbial products in patients with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *J Infect Dis* **2009**;199: 1664-70.
30. Baba CS, Makharia GK, Mathur P, et al. Chronic diarrhea and malabsorption caused by *Leishmania donovani*. *Indian J Gastroenterol* **2006**; 25:309-10.
31. Hicks L, Kant P, Tay PH, et al. Visceral leishmaniasis presenting with intestinal failure: a case report and literature review. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2009**; 21:117-12.
32. Santos-Oliveira JR, Regis EG, Leal CR, et al. Evidence that lipopolisaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. . *PLoS Negl Trop Dis* **2011**; 5:e1198.
33. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol* **2006**; 146: 124-32.



34. Nylén S, Maurya R, Eidsmo L, et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *J Exp Med* **2007**; 204:805-17.
35. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília 2006.
36. Brasil, Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites virais. Available in <http://www.aids.gov.br/aidsportal.saude.gov.br>.
37. Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol* **2011**; 49:3892-904.
38. McCoy JJ, Beetham JK, Ochs DE, et al. Regulatory sequences and a novel gene in the msp (GP63) gene cluster of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* **1998**; 95:251-65.
39. Estes JD, Harris LD, Klatt NR, et al. Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathog* **2010**; 6:e1001052.
40. Brenchley JM, Douek DC. Microbial translocation across the GI tract. *Annu Rev Immunol* **2012**; 30:149-73.
41. Antinori S, Calattini S, Longhi E, et al. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. *Clin Infect Dis* **2007**; 44:1602-10.
42. Lieberman JM, Sacchetti J, Marks C, et al. Human intestinal fatty acid binding protein: report of an assay with studies in normal volunteers and intestinal ischemia. *Surgery* **1997**; 121:335-42.
43. Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* **2005**; 3:36-46
44. 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.
45. Medrano FJ, Rey C, Leal M, et al. Dynamics of serum cytokines in patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection. *Clin Exp Immunol* **1998**; 114:403-7.

46. Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, et al. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog* **2010**; 6:e1000852
47. Balkhair A, Ben Abid F. Gastric and cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis in a patient with advanced HIV. *Int J Infect Dis* **2008**; 12:111-3.
48. Gómez Senent S, Adan Merino L, Mora Sanz P. Kala azar with gastric involvement. *Gastroenterol Hepatol* **2009**; 32:176-7.
49. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:791-800.

Table 1. Multivariate analysis of CD38-positive cells on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by CD4<sup>+</sup> T cell count, viral load, LPS, sCD14, MIF and IFABP levels and *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in *Leishmania*/HIV-1 co-infected and HIV-1 infected patients.

Independent variables	Dependent variable		
	Percentage of CD38 <sup>+</sup> on CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes		
	Coef <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup>	P
CD4 <sup>+</sup> T cell count, cells/mm <sup>3</sup>	-0.021	0.014	0.875
Viral load levels (copies/mL)	0.049	0.001	0.624
Leishmaniasis (presence or absence)	0.817	5.478	0.0001
LPS levels (pg/mL)	0.373	0,213	0.001
sCD14 levels (pg/mL)	0.061	0.002	0.609
IFABP levels (pg/mL)	0.153	0.002	0.097
MIF levels (ng/mL)	0.124	0.118	0.218

1 Coef - Correlation coefficient, 2 SE - Standard error , VL – viral load, LPS – lipopolysaccharide, sCD14 - soluble CD14, IFABP – intestinal fatty acid binding protein, MIF – macrophage migration inhibitory factor.

Obs. HIV-1 infected patients were also included in this analysis.

Table 2. Plasma proinflammatory cytokine levels in the study population.

Cytokines pg/mL	Active AVL/HIV (n = 5)	Remission AVL/HIV (n = 7)	HIV-1 Infected	Active AVL (n = 5)	Remission AVL (n = 7)	Healthy Subjects (n = 8)	<i>P</i> Value*	<i>P</i> Value**
IFN- $\gamma$	2,795 (1,344 - 7,104)	2,411 (1,415 – 6,157)	150 (56-332)	1,143 (445 – 4,446)	783 (367–3,482)	19 (5.3–145)	0.0001	0.0001
TNF	490 (284-1,503)	374 (302-1,207)	165 (86-200)	143.5 (37.7-555)	100 (57.3-588.5)	2 (1.5-8.5)	0.0001	0.001
IL-6	536 (61-6,128)	947 (276-9,068)	81 (45-110)	416 (211-557)	49 (30-115)	1 (0,3-2,5)	0.0001	0.006
IL-8	2,447 (1,050-10,844)	3,244 (2,439- 17,999)	170 (130-220)	8,000 (1,887- 13,578)	4,325 (427-8,988)	2.5 (1.5-3.0)	0.01	0.006
IL-1 $\beta$	16 (3.5-209)	112.5 (17.1-351)	15 (10-20)	9.7 (4-226)	7.5 (2-138)	0.5 (0.4-0.62)	0.01	0.0001

IL-17	231 (118-417)	256 (161-500)	65.2 (46-90)	288 (102-398)	193.5 (131-626.6)	2 (2-16)	0.0008	0.0006
MIP-1 $\beta$	2,157 (430-3,928)	546 (441-923)	243 (165-318)	730.3 (418-3,363)	571.5 (426-1,111)	14.3 (0.1-50.2)	0.008	0.008

n-number of patients, IL-interleukine, TNF-tumor necrosis factor, MIP- macrophage inflammatory protein-1beta.

Note: Data are median (interquartile range) values.

\*Among active visceral co-infected patients (AVL/HIV) and HIV-1 infected patients.

\*\* Among remission visceral co-infected patients and HIV-1 infected patients.

Table 3. Multivariate analysis of each proinflammatory cytokine measured (dependent variable) by viral load, LPS, sCD14 and *Leishmania* infection (independent variables) in *Leishmania*/HIV-1 co-infected patients.

Dependent variables	Independent variables			
	LPS	Viral load	sCD14	<i>Leishmania</i>
TNF	0.296	0.709	0.980	0.003
IL-1 $\beta$	0.685	0.766	0.979	0.122
IL-6	0.018	0.849	0.527	0.005
IL-8	0.008	0.968	0.019	0.001
IL-17	0.939	0.856	0.246	0.001
MIP-1 $\beta$	0.968	0.563	0.011	0.001
MIF	0.141	0.399	0.877	0.969

1 Coef - Correlation coefficient, 2 SE - Standard error , LPS – lipopolysaccharide, MIP-1 $\beta$  – macrophage inflammatory protein, MIF - macrophage migration inhibitory factor.

Obs. HIV-1 infected patients were also included in this analysis.

Figure 1. Cellular activation levels and blood quantification of *Leishmania (Leishmania) infantum* DNA in American visceral leishmaniasis/HIV-AIDS patients (AVL/HIV) co-infected patients. (A) Percentage of CD38-positive cells on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in AVL/HIV patients during the active phase (solid squares) and in remission (solid triangles), HIV-AIDS cases (solid circles) and healthy subjects (stained squares). (B) Real-time PCR for parasite load was performed on blood samples collected from AVL/HIV patients during active disease (solid squares) and in remission (solid triangles). AVL patients without HIV-1 infection were included as controls for both clinical phases of leishmaniasis (active: open squares, remission: open triangles). The results are expressed as the number of promastigote forms per mL of blood. (C) Correlation between the parasite load and the percentage of CD38-positive cells on CD8<sup>+</sup> T cells in active AVL/HIV-AIDS patients. (D) Correlation between the parasite load and the percentage of CD38-positive cells on CD8<sup>+</sup> T cells in AVL/HIV-AIDS patients in remission. Each point represents one subject. Horizontal bars indicate the median value. Dashed line represents the sensitivity of the real-time PCR assay.

Figure 2. Microbial translocation and gut damage in American visceral leishmaniasis/HIV-AIDS patients (AVL/HIV). (A) Plasma lipopolysaccharide (LPS) levels and (B) soluble CD14 (sCD14) levels in AVL/HIV co-infected patients during active disease and in remission, HIV/AIDS cases and health subjects (HS). (C) Correlation between plasma LPS and sCD14 levels in AVL/HIV-AIDS and HIV-AIDS patients. (D) Plasma levels of intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP). (E) Correlation between plasma LPS and I-FABP levels in AVL/HIV-AIDS and HIV-AIDS patients. (F) Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF). Each point represents one subject. The horizontal bars indicate the median value.

Supplementary Table. Clinical and laboratorial characteristics of study patients and healthy subjects.

	Active AVL/HIV (n=12)	Remission AVL/HIV (n=9)	HIV-1 patients (n=16)	Active AVL (n=5)	Remission AVL (n=7)	Healthy Subjects (n=14)
Parasite load	53,356 PF/mL (34,913 – 108,786)	1.2 PF/mL (1- 22,640)	-	2,856 PF/mL (1,440 – 15,350)	1.2 PF/mL (1 – 400)	-
LPS	52 pg/mL (49.5 - 57.7)	53 pg/mL (47.5 - 55)	50.6 pg/mL (45.7 - 53)	41.5 pg/mL (37.6 – 43)	34.3 pg/mL (29.4 – 38)	26 pg/mL (14 – 29)
Viral load (copies/mL)	50,334 (20,000 – 119,000)	142,240 (24,025 - 279,321)	12,010 (2,000 – 136,625)	-	-	-
CD4 <sup>+</sup> T	114 cells/mm <sup>3</sup> (45 – 118)	62 cells/mm <sup>3</sup> (52 - 127)	380 cells/mm <sup>3</sup> (223 - 450)	426 cells/mm <sup>3</sup> (137 – 553)	727 cells/mm <sup>3</sup> (588 – 829)	1,099 cells/mm <sup>3</sup> (951 – 1,304)
sCD14	7,295 ng/mL (6,213 - 8,719)	6,508 ng/mL (5,299 - 8,219)	5,438 ng/mL (5,185 - 6,240)	5,133 ng/mL (4,213 – 6,800)	3,556 ng/mL (2,650 – 4,034)	2,908 ng/mL (2,308 – 3,271)
IFABP	1,721 pg/mL (1,315 - 2,1050)	1,862 pg/mL (1,265 - 2,556)	1,419 pg/mL (818 - 2,403)	918 pg/mL (536 – 1,360)	794 pg/mL (606 – 1,099)	234.2 pg/mL (73.8 – 718)

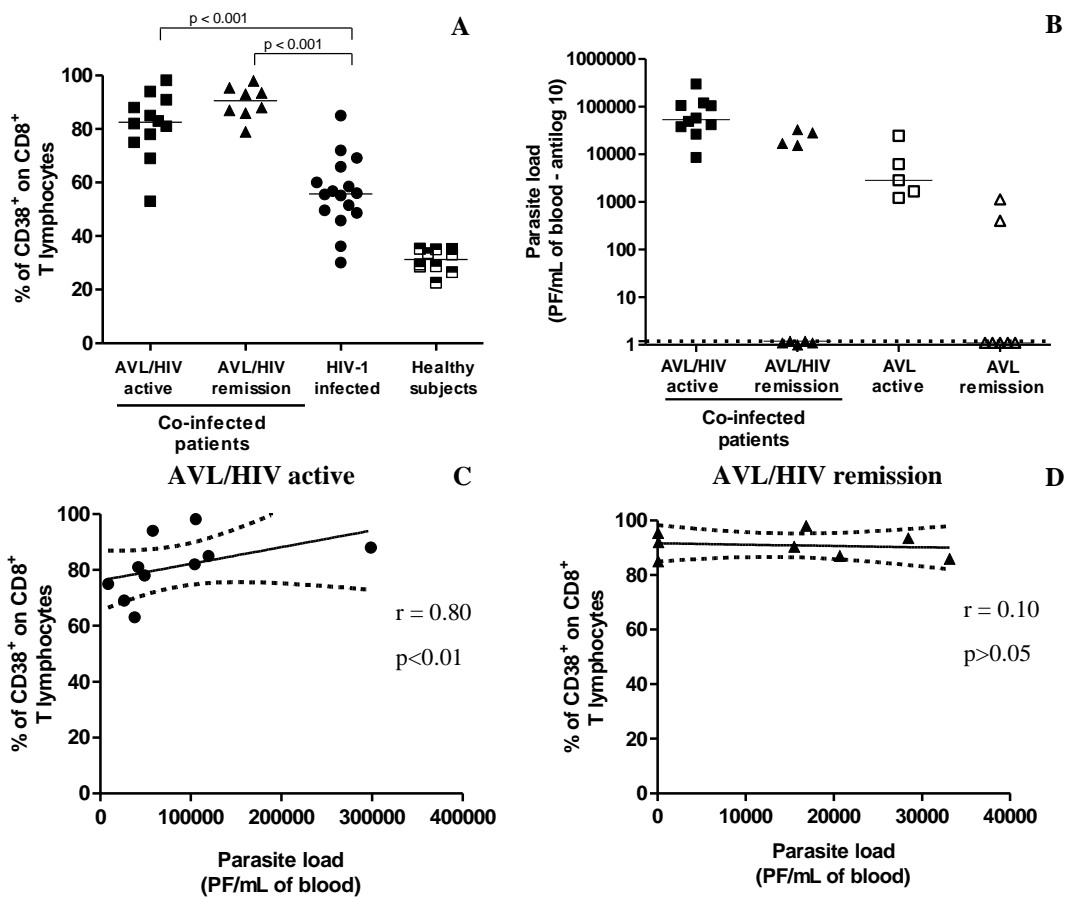


MIF	57.4 ng/mL (40.5 - 68.5)	58.3 ng/mL (35.8- 66.5)	57.3 ng/mL (46.2- 72.4)	32 ng/mL (28 – 38.9)	15.6 ng/mL (12.6 – 27.5)	5.1ng/mL 3.7 - 7,2
-----	-----------------------------	----------------------------	----------------------------	-------------------------	-----------------------------	-----------------------

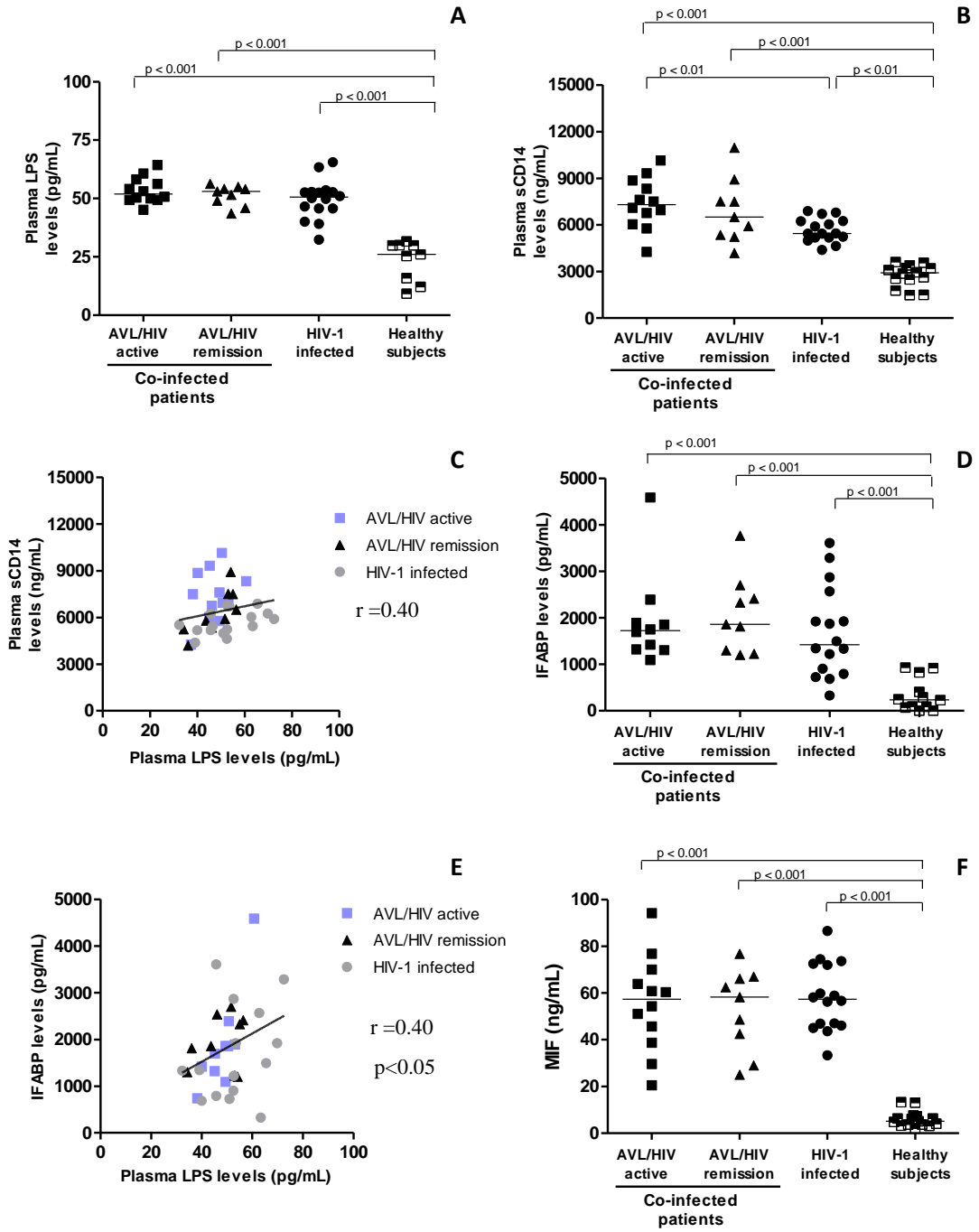
---

N= number, AVL – American visceral leishmaniasis, PF/mL – parasitic forms per mL of blood. Data are median (interquartile range) values.

Figure 1.



**FIGURE 2.**



## 5.5 APÊNDICE DE RESULTADOS

### 5.5.1 Introdução

Recentemente, a ativação crônica do sistema imune observada nos pacientes infectados pelo HIV-1 vem sendo associada ao processo de imunosenescência, caracterizado pela deterioração das atividades funcionais dos linfócitos T (Appay e Rowland-Jones, 2002). Esta deterioração pode ser observada clonal ou sistemicamente. A ativação persistente e o alto *turnover* de células T, principalmente de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos, devido a uma replicação viral crônica, mesmo que em níveis basais pode culminar em um processo de exaustão clonal, através da perda da capacidade replicativa. Considerando que a LV também cursa com uma intensa ativação do sistema imune nos pacientes acometidos, ela também pode contribuir para acelerar o fenômeno da senescência. Dessa maneira, o objetivo desse apêndice de resultados foi investigar o grau de imunosenescência apresentado pelos pacientes LV/HIV-1 e o quão este difere dos indivíduos com apenas uma das enfermidades (casos de HIV-1 e casos de LV apenas), bem como dos indivíduos sadios para ambas as enfermidades.

A avaliação do perfil de distribuição do repertório de linfócitos T (mono/oligoclonal/policlonal), através da expressão de regiões variáveis da cadeia beta (V $\beta$ ) também foi investigada por citometria de fluxo. Essa estratégia pode ajudar a compreender as diferenças qualitativas na resposta imune nos pacientes coinfectados e estabelecer possíveis correlações com a evolução clínica. Além disso, a análise do repertório pós-TARV e pós-tratamento anti-*Leishmania* poderá fornecer dados sobre uma possível correlação entre a expansão de determinadas famílias V $\beta$  e o *status* imune dos pacientes.

### 5.6 Casuística

Para estas avaliações foram incluídos 18 casos de coinfeção com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1), dos quais 13 foram avaliados na fase ativa da LV e 12 no pós-tratamento específico para a LV. Entre os 13 pacientes admitidos na fase ativa da doença, sete deles foram acompanhados até a fase logo após o tratamento para *Leishmania* e, portanto, estão incluídos dentre os 12 pacientes do pós-tratamento. Paralelamente, estudamos indivíduos portadores de leishmaniose visceral (quatro casos) sem história de

infecção pelo HIV-1, indivíduos infectados pelo HIV-1, sem histórico de leishmaniose visceral (seis casos) e indivíduos sadios para ambas as infecções (n = 13). Os pacientes foram incluídos no estudo no período de março de 2011 a julho de 2012. O universo de pacientes coinfectados *Leishmania*/HIV foi estabelecido nos centros de saúde com os quais colaboramos e os mesmos, continuam em acompanhamento clínico-ambulatorial.

Os pacientes LV/HIV-1 recrutados para este apêndice de resultados foram provenientes de três instituições de saúde: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP (um caso), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, UFMS (quatro casos), Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, Minas Gerais (13 casos). Estes últimos 13 pacientes coinfectados fazem parte da tese de doutorado da Dra. Glaucia Cota, cujo objetivo é a avaliação clínica prospectiva, bem como, os fatores possivelmente relacionados ao aparecimento dos episódios de reativação da LV. Os pacientes que foram estudados receberam o tratamento específico preconizado pelo Ministério da Saúde e terão seu acompanhamento garantido nas unidades de saúde as quais eles são vinculados (Brasil, 2011).

Os pacientes foram considerados infectados pelo HIV-1 quando apresentaram os exames sorológicos ELISA e Western Blot positivos, conforme protocolo do Ministério da Saúde (Brasil, 2004).

O diagnóstico de leishmaniose visceral foi estabelecido através da detecção de formas amastigotas de *Leishmania* nas células da medula óssea (esfregaço ou histopatológico) e/ou visualização de formas promastigotas do parasito em culturas (meio NNN) de aspirado medular.

O estudo foi transversal e longitudinal, uma vez que os pacientes coinfectados LV/HIV-1 foram incluídos no protocolo de estudo durante o episódio ativo de leishmaniose visceral, porém apenas sete deles foram acompanhados prospectivamente no tempo logo após o tratamento anti-*Leishmania*. Estes sete pacientes foram provenientes de Minas Gerais e permanecem em acompanhamento até o presente momento. Tal estudo prospectivo permitirá o estudo de parâmetros imunológicos tomando por princípio a análise das condições clínicas e laboratoriais de base apresentadas pelo paciente no início do estudo.

Os pacientes e os voluntários que aceitaram participar deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 5). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da FIOCRUZ (protocolo nº 290/05) e pelo

Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), sob o número 0045.0.011.009-07 (CAAE – anexo 6).

## 5.7. METODOLOGIA

### 5.7.1 Obtenção de material biológico para ensaios laboratoriais

No momento de admissão no protocolo de estudo foram coletados 45 mL de sangue periférico de cada indivíduo: 3 tubos com heparina (10 mL cada), 1 tubo sem anticoagulante (5 mL) e 2 tubos com EDTA (5 mL cada). A coleta era repetida a cada nova visita do paciente ou a qualquer momento em que havia mudança no curso clínico da infecção. Tal coleta foi feita de acordo com o critério clínico de acompanhamento.

As células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas a partir do sangue heparinizado para: (1) caracterização fenotípica das células mononucleares por citometria de fluxo, (2) os ensaios de estimulação *in vitro* frente a estímulos antigênicos (antígenos de *Leishmania* e do HIV), (3) caracterização fenotípica quanto ao repertório dos linfócitos T circulantes e das células reativas a antígenos de *Leishmania* e HIV-1 por citometria de fluxo. O sangue total conservado em EDTA foi utilizado para a contagem absoluta dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e uma alíquota foi armazenada a -70°C para posterior quantificação da carga parasitária através da detecção do DNA do parasito, por PCR em tempo real. Do plasma obtido do tubo com EDTA foram geradas duas alíquotas estocadas a -70°C para a quantificação da carga viral. O soro foi dividido em alíquotas e estocado a -4°C até o momento do uso.

Visando garantir a qualidade das amostras, as três unidades colaboradoras de outros estados brasileiros recebiam um kit contendo caixa de transporte de material biológico à temperatura ambiente (categoria B, UN3373, Imer, Brasil), tubos para a coleta de sangue e alíquotas, conforme descrito acima. Além disso, o kit continha instruções para a coleta de sangue, alíquotagem, armazenamento das amostras, termos de consentimento livre e esclarecido e ficha clínico-epidemiológica. Os tubos com heparina e um tubo com EDTA foram enviados ao Rio de Janeiro, através de transporte aéreo, seguindo as normas de segurança da IATA (*International Air Transportation Association*). O tempo decorrido entre a coleta de sangue e o processamento do material foi em média de 24 horas. O soro, o plasma do tubo de EDTA (carga viral) e o sangue total alíquotados na unidade local

foram enviados posteriormente ao IOC/FIOCRUZ em caixa de transporte de material biológico com temperatura controlada (categoria B, UN3373, Imer, Brasil).

### **Avaliação virológica**

#### 5.7.2 Determinação do número de cópias de RNA do HIV-1 no plasma sanguíneo.

A quantificação do número de cópias de RNA viral foi realizada a partir do plasma dos pacientes, através da tecnologia de amplificação bDNA. A técnica foi realizada utilizando o kit Versant<sup>®</sup> HIV RNA 3.0 assay (Siemens, Tarrytown, NY, EUA) e o intervalo de detecção deste sistema é de 50 a 500.000 cópias de RNA/mL de plasma.

Este ensaio foi realizado no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, IOC/FIOCRUZ, Centro de Referência para o Ministério da Saúde quanto à quantificação da carga viral plasmática, determinação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e genotipagem viral.

#### 5.7.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e estimulação *in vitro* com antígenos específicos

O sangue heparinizado foi diluído na proporção 1:1 em meio RPMI 1640 completo, ou seja, suplementado com 10mM de hepes, 1,5 mM de L-glutamina, 0,04 mM de 2-mercaptoetanol e antibióticos (penicilina e estreptomicina) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). As CMSP foram obtidas através de centrifugação em Ficoll-Hypaque (Histopaque – 1119, Sigma, EUA) obedecendo a proporção 1:2, a 970g por 20 minutos a 20°C (Thermo Scientific IEC/CL40R, Thermo Electron Corporation, Alemanha). O anel contendo as CMSP foi coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur. As células obtidas foram lavadas três vezes por centrifugação a 4°C e utilizadas para ensaios de estimulação *in vitro* e para imunofenotipagem. O número de células viáveis foi avaliado por exclusão da incorporação do azul de Tripán (Sigma, EUA) e a contagem realizada na câmara de Neubauer (Zeiss Axioskop 2, Carl Zeiss, Alemanha).

As células utilizadas para a estimulação *in vitro* foram ajustadas para  $2 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI 1640 completo acrescido de 10% de soro AB RH<sup>+</sup> humano inativado (Sigma, EUA) e cultivadas em placas de 24 poços de fundo chato (Nunclon<sup>™</sup>, Nunc Brand Products, Dinamarca). As CMSP foram estimuladas com  $10^6$  promastigotas

de *L. infantum* (IOC-2930) e antígeno do nucleocapsídeo viral – p24 (Protein Sciences, Meriden, CT, EUA) na presença da citocina IL-2 recombinante (Sigma, EUA). Um dos poços recebeu apenas células em meio RPMI completo, sendo utilizado como controle. As CMSP foram cultivadas por três dias a 37°C em estufa com atmosfera úmida em presença de CO<sub>2</sub> (Napco® Automatic CO2 Incubator, Precision Scientific Inc., Chicago, IL, EUA). No terceiro dia, os sobrenadantes das culturas foram coletados e estocados em um freezer –70°C para posterior dosagem de citocinas e as células estimuladas foram utilizadas para a imunofenotipagem.

O volume excedente das CMSP foi criopreservado para avaliações posteriores. Para tal, as células foram centrifugadas a 530g por 10 minutos a 4°C, e uma vez descartado o sobrenadante, foram ressuspensas em 1 mL de solução de criopreservação previamente gelada, que consiste de soro fetal bovino-SFB 90% (Sigma, EUA) e DMSO 10% (dymethyl sulphoxide, Sigma, EUA). As células foram congeladas *overnight* a -70°C no Mr. Frosty (Nalgene®, Rochester, NY, USA) e em seguida foram transferidas para um *container* contendo N<sub>2</sub> líquido (Thermolyne, Locator 4, Cryobiological Storage System, CA, EUA).

## **Parâmetros utilizados para a avaliação do grau de comprometimento do sistema imune**

### 5.7.4 Contagem dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

A determinação dos linfócitos T CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> foi realizada a partir de amostras de sangue venoso, através do sistema BD TruCount® (BD – Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA), o qual baseia-se na utilização de *beads* (“bilhas magnéticas”) de referência para a quantificação absoluta destas subpopulações. Um painel de anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de CD4, CD8 e CD3, triplamente marcados com fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e peridina-clorofila (PercP), respectivamente (TRITest®, BD Biosciences, EUA) também foi utilizado. As amostras foram avaliadas por citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento FACSCalibur® (BD Biosciences) e um programa computacional apropriado para esta análise (Multiset®, BD Biosciences).

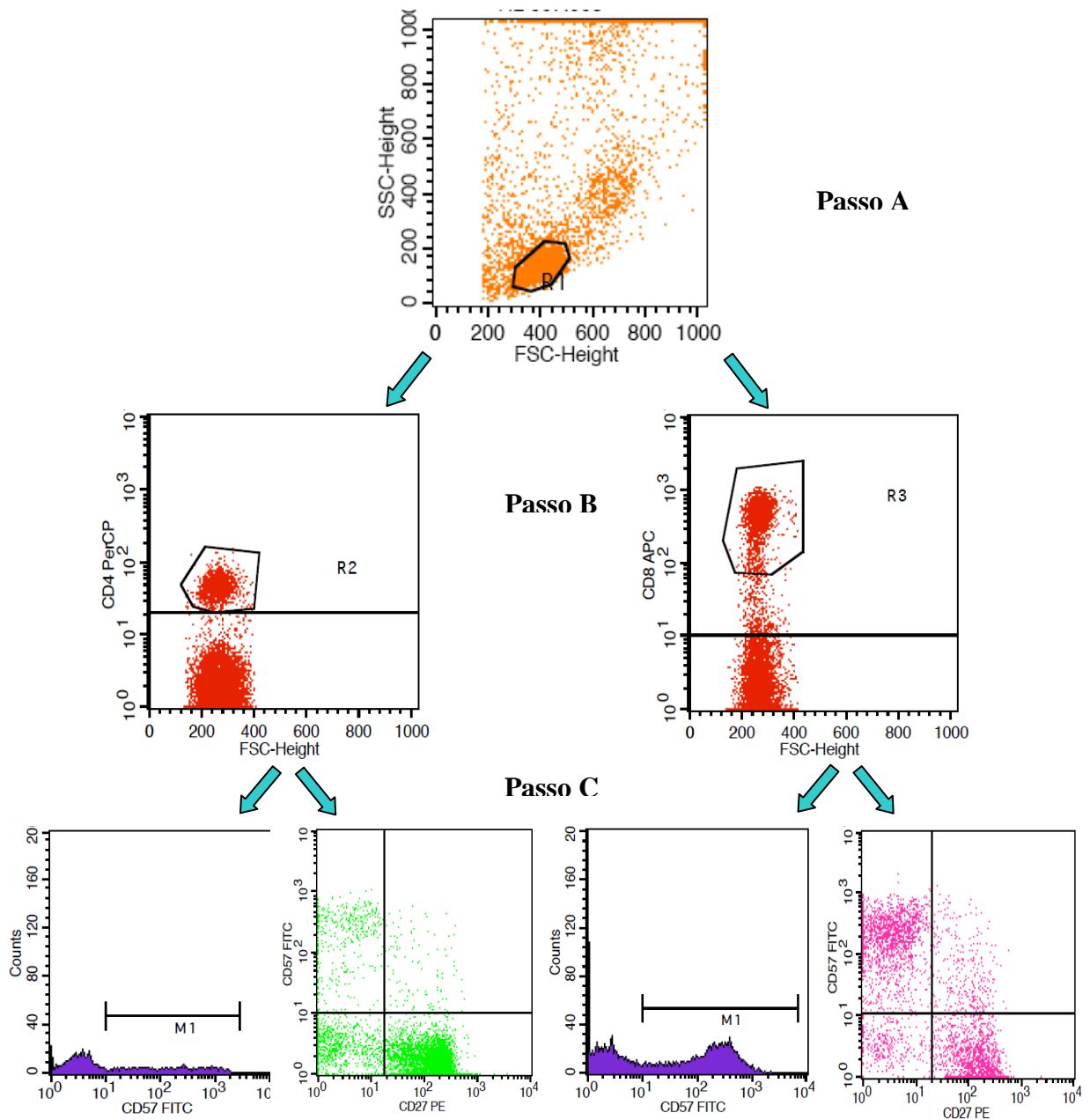


### 5.7.5 Caracterização fenotípica das CMSP quanto à senescência replicativa por citometria de fluxo.

Esta análise visou à avaliação da correlação do status clínico e imunológico do paciente com o seu respectivo grau de imunosenescência. Dessa maneira, a marcação de superfície foi realizada após as células serem ajustadas para  $2 \times 10^5$  por tubo em 100ul de PBS (salina tamponada com fosfato) contendo 0,1% de azida-sódica e incubadas com 5ul dos seguintes anticorpos monoclonais: A) subpopulação linfocitária: CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (anticorpo anti-CD4 PerCP e anti-CD8 APC humano); B) senescência replicativa: CD57 (anticorpo anti-CD57 humano FITC) e CD27 (anticorpo anti-CD27 humano PE), todos adquiridos da BD Biosciences Pharmingen<sup>TM</sup>, Califórnia, EUA).

Após a incubação por 30 minutos, as células foram lavadas por centrifugação a 530g por 10 minutos a 4°C, fixadas com PBS a 1% de paraformaldeído (Sigma, EUA), e conservadas a 4°C até serem adquiridas e analisadas por citometria de fluxo. Para a aquisição e análise dos resultados de todas as avaliações citofluorimétricas foram utilizados o equipamento FACSCalibur®, e o software de análise BD Cell Quest Pro<sup>TM</sup> (ambos adquiridos da BD Biosciences, EUA). Para cada amostra foram adquiridos cerca de 10.000 eventos dentro da região definida (população de linfócitos).

O protocolo de análise utilizado está ilustrado no Esquema 1. A região que continha a população de linfócitos T, foco de nosso estudo, foi definida de acordo com o tamanho (FSC – *forward scatter*) e a granularidade (SSC – *side scatter*) das células (passo A). As subpopulações linfocitárias foram definidas por fluorescência (PerCP ou APC) e tamanho (passo B). Posteriormente, para se definir a proporção de células que expressavam o fenótipo de senescência replicativa, foram realizadas duas análises. Na primeira, avaliou-se o percentual de células senescentes (CD57<sup>+</sup>) dentro das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (passo C). Na segunda, avaliou-se o percentual de células simples-positivas CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> dentro das subpopulações linfocitárias de T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (passo C).



**Esquema 1.** Etapas do protocolo de análise citofluorimétrica para as moléculas associadas à senescência replicativa (CD57 e CD27). R1-população de linfócitos definida por tamanho e granularidade e R2 e R3- populações de linfócitos T expressando as moléculas CD4 e CD8, respectivamente. FSC – *forward scatter*, SSC – *side scatter*.

### 5.7.6 Análise do perfil do repertório de receptores de linfócitos T (TCR) por citometria de fluxo

Para a avaliação do repertório de linfócitos T utilizamos um kit de anticorpos monoclonais específicos para 24 diferentes cadeias pertencentes a 19 das 26 famílias V $\beta$  conhecidas (IOTest® Beta Mark – Beckman-Coulter, Fullerton, CA, EUA). Neste kit, três diferentes V $\beta$  são analisados simultaneamente no mesmo tubo, sendo os anticorpos marcados com FITC, PE e com a combinação FITC-PE. Este esquema de marcação permitiu analisar a expressão das cadeias nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> separadamente, utilizando-se um anticorpo anti-CD4 marcado com clorofila-peridina (PerCP) e um anticorpo anti-CD8 marcado com alofocianina (APC), conforme descrito no item acima, utilizando ainda o mesmo citômetro e software. Para cada amostra foram adquiridos 20.000 eventos dentro da região definida (população de linfócitos). A relação dos 24 anticorpos que constituem este kit, bem como, suas especificidades antigênicas encontra-se na Tabela 1.

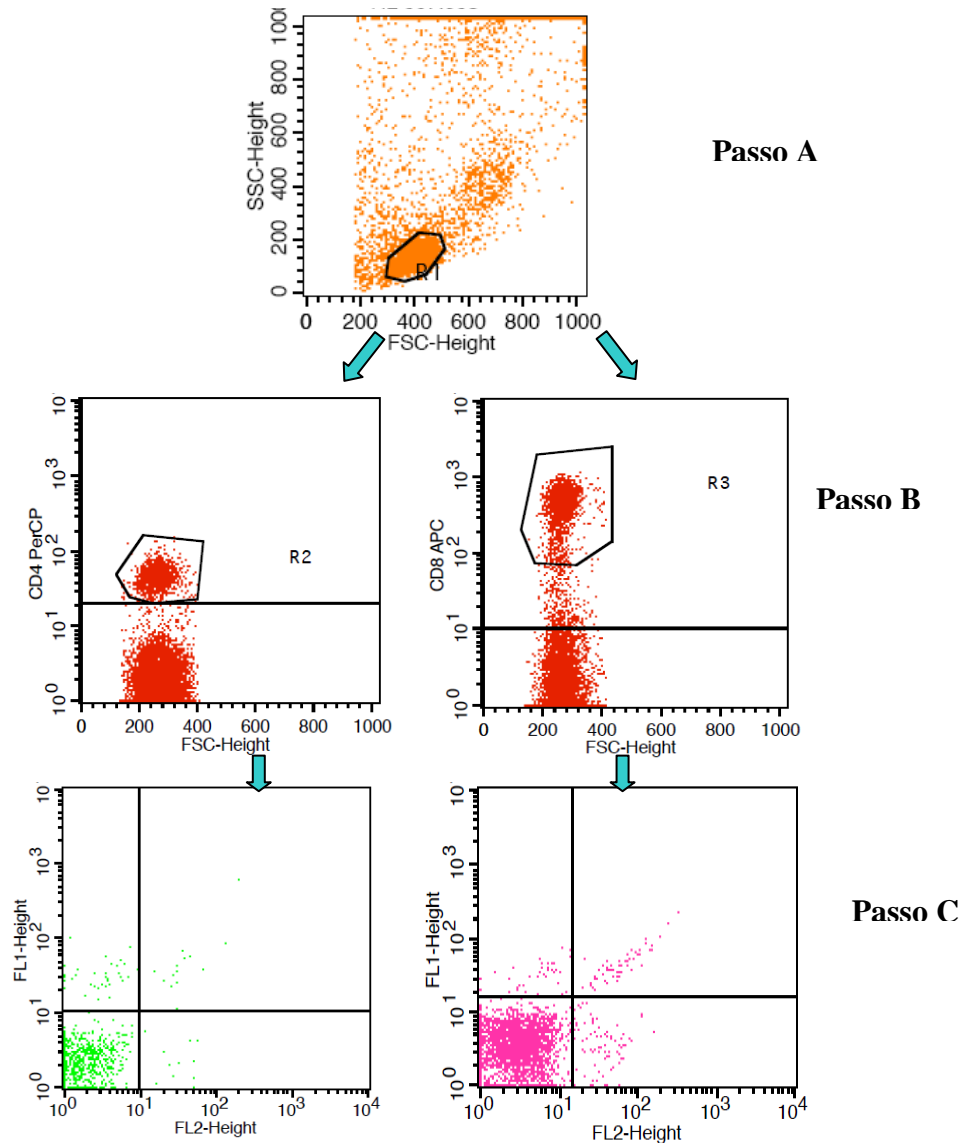
Tabela 1. Descrição dos 24 anticorpos disponíveis no kit IOTest Beta Mark utilizados para a análise do repertório V $\beta$  e suas especificidades antigênicas.

Anticorpos V $\beta$ *	Especificidades	Anticorpos V $\beta$ *	Especificidades
V $\beta$ 1	V $\beta$ 1.1, 1.2	V $\beta$ 12	V $\beta$ 12
V $\beta$ 2	V $\beta$ 2	V $\beta$ 13.1	V $\beta$ 13.1, 13.4
V $\beta$ 3	V $\beta$ 3	V $\beta$ 13.2	V $\beta$ 13.2
V $\beta$ 4	V $\beta$ 4	V $\beta$ 13.6	V $\beta$ 13.6
V $\beta$ 5.1	V $\beta$ 5.1	V $\beta$ 14	V $\beta$ 14
V $\beta$ 5.2	V $\beta$ 5.2	V $\beta$ 16	V $\beta$ 16
V $\beta$ 5.3	V $\beta$ 5.3	V $\beta$ 17	V $\beta$ 17
V $\beta$ 7.1	V $\beta$ 7.1, 7.3	V $\beta$ 18	V $\beta$ 18
V $\beta$ 7.2	V $\beta$ 7.2	V $\beta$ 20	V $\beta$ 20
V $\beta$ 8	V $\beta$ 8	V $\beta$ 21.3	V $\beta$ 21.3
V $\beta$ 9	V $\beta$ 9	V $\beta$ 22	V $\beta$ 22
V $\beta$ 11	V $\beta$ 11	V $\beta$ 23	V $\beta$ 23

\*Nomenclatura retirada de Wei et al. (1994).

A estratégia utilizada para a análise do perfil de distribuição do repertório do TCR foi semelhante àquela descrita para a avaliação da senescência replicativa (Passo A e B). Em seguida, a expressão das diferentes famílias V $\beta$  foi determinada nos gráficos de *dot*

*plot* criados dentro das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (Passo C), de modo que a fluorescência emitida por FITC (quadrante superior esquerdo) determina um segmento V $\beta$ , a emissão de PE (quadrante inferior direito) define um segundo V $\beta$  e a dupla emissão FITC-PE define um terceiro segmento (quadrante superior direito).



Esquema 2. Etapas do protocolo de análise citofluorimétrica para a determinação do percentual de células T expressando determinada cadeia V $\beta$ . R1-população de linfócitos definida por tamanho e granularidade e R2 e R3- populações de linfócitos T expressando as moléculas CD4 e CD8, respectivamente. FSC – *forward scatter*, SSC – *side scatter*.

### 5.7.7 Análise Estatística

As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste Mann Whitney (não-paramétrico) e para as análises de correlação utilizamos o teste de Correlação de Spearman (GraphPad InStat, GraphPad Software, San Diego, EUA – versão 5,0). Quando três ou mais grupos foram comparados simultaneamente, foi utilizado o teste ANOVA, não paramétrico (Kruskal-Wallis) e o pósteste de Dunns. Foram consideradas significativas as diferenças com valores de  $p < 0,05$ .

## 5.8 RESULTADOS

### 5.8.1 Características clínicas dos pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1/AIDS (LV/HIV-1)

Foram avaliados 18 pacientes de leishmaniose visceral infectados pelo HIV-1 (LV/HIV-1). Todos os pacientes apresentavam doença ativa (abertura de caso, primeiro episódio ou reativação), no momento de admissão do protocolo. O esquema de acompanhamento está descrito na Tabela 2. Em vista do acompanhamento clínico e de todas as análises ainda estarem em andamento, os achados que serão descritos neste apêndice de resultados, em relação à senescência replicativa e ao perfil de distribuição do repertório das famílias  $V\beta$  foram baseados nos resultados obtidos para treze pacientes LV/HIV-1 na fase ativa da doença e de doze pacientes na fase de remissão clínica (logo após o tratamento anti-*Leishmania*), conforme descrito na casuística. Dentre os treze pacientes de LV/HIV-1 ativos, seis foram avaliados apenas na fase ativa da LV, enquanto os outros sete foram acompanhados desde a fase ativa até a fase logo após o tratamento. No que se refere aos 12 pacientes coinfectados, avaliados após o tratamento específico, encontram-se os sete pacientes do acompanhamento prospectivo e cinco que só foram avaliados no pós-tratamento. A Tabela 2 mostra em vermelho os sete pacientes acompanhados desde a fase ativa da LV e em azul aqueles avaliados apenas no pós-tratamento específico para *Leishmania*.

**Tabela 2.** Avaliação prospectiva dos pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1) e seus respectivos momentos clínicos de acompanhamento.

Pacientes	Momentos clínicos de acompanhamento							
	Fase ativa	Pós-tto	2mptto	4mptto	6mptto	8mptto	10mptto	12mptto
Pt1*	[Red bar from Fase ativa to 12mptto]							
Pt2*	[Red bar from Fase ativa to 10mptto]							
Pt3*	[Red bar from Fase ativa to 8mptto]							
Pt4*	[Red bar from Fase ativa to 8mptto]							
Pt5*	[Red bar from Fase ativa to 8mptto]							
Pt6	[Light blue bar from Fase ativa to 6mptto]							
Pt7	[Light blue bar from Fase ativa to 4mptto]							
Pt8	[Light blue bar from Fase ativa to 2mptto]							
Pt8	[Light blue bar from Fase ativa to 2mptto]							
Pt10	[Light blue bar from Fase ativa to 2mptto]							
Pt11*	[Red bar from Fase ativa to 4mptto]							
Pt12*	[Red bar from Fase ativa to 2mptto]							
Pt13	[Green bar from Fase ativa to Fase ativa]							
Pt14	[Green bar from Fase ativa to Fase ativa]							
Pt15	[Green bar from Fase ativa to Fase ativa]							
Pt16	[Green bar from Fase ativa to Fase ativa]							
Pt17	[Green bar from Fase ativa to Fase ativa]							
Pt18	[Green bar from Fase ativa to Fase ativa]							

\*Vermelho – pacientes acompanhados prospectivamente desde a fase ativa da doença. Azul – pacientes incluídos no estudo desde a fase ativa da LV, porém com os parâmetros imunológicos avaliados apenas na fase de pós-tratamento (n = 5). As barras verdes representam os pacientes avaliados apenas na fase ativa da doença. Mptto- meses pós-tratamento.

As principais características desse grupo de pacientes estão apresentadas na tabela 3. A média de idade dos pacientes foi de 39 anos, mediana de 38 anos (variação de 20 a 60 anos). A via sexual foi apontada como principal categoria de exposição ao HIV em 83,3% dos pacientes (n=15), dos quais 12 alegaram ter comportamento sexual de risco. Dentre estes últimos, alguns relataram terem sido usuários de drogas injetáveis por algum momento da vida. Para os demais pacientes (16,7%) a utilização de drogas injetáveis foi considerada a principal categoria de exposição ao HIV-1. Quatorze pacientes eram do sexo masculino e todos apresentaram a razão de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> inferior a 1,0 ao longo de todo o estudo. Os pacientes fizeram uso de TARV com o esquema de 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. Considerando os 18 pacientes coinfectados ativos, apenas doze (66,7%) já faziam uso de TARV no momento da inclusão no estudo (variação de 6 meses a 10 anos). Dois casos (11,1%) iniciaram a terapia antiretroviral na fase de admissão no protocolo de estudo já que a infecção pelo HIV e a leishmaniose foram diagnosticados simultaneamente. Dois pacientes iniciaram a TARV ao fim do tratamento específico para a LV (11,1%) e outros dois pacientes abandonaram o tratamento antiretroviral pouco antes da descoberta da LV (11,1%). Quando os pacientes foram avaliados na fase pós-tratamento para *Leishmania* (n=12) todos já estavam sob uso de TARV por mais de seis meses a partir do momento da coleta de sangue inicial, excetuando-se três pacientes que estavam com aproximadamente 30 dias de TARV (um deles por ter sido abertura de caso e os outros dois por terem reiniciado a TARV, anteriormente abandonada, com o fim do tratamento para LV). Um dos pacientes que abandonou a TARV foi a óbito no fim do tratamento anti-*Leishmania* e o outro, apesar da TARV ter sido novamente oferecida na ocasião do fim do tratamento para LV, abandonou o seguimento.

A maioria dos pacientes apresentou um estado avançado de imunossupressão causada pela infecção pelo HIV-1 (T CD4<sup>+</sup> abaixo de 250 células/mm<sup>3</sup>) no momento de entrada no estudo. A contagem média de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi de 96 células/mm<sup>3</sup>, com mediana de 86,5 linfócitos/mm<sup>3</sup>, variando de 5 a 250 células/mm<sup>3</sup>. Os pacientes foram classificados no estágio C3, segundo os critérios do CDC para a classificação da infecção pelo HIV - CDC, 1993.

O diagnóstico da LV foi realizado através da pesquisa direta de formas amastigotas coradas com Giemsa obtidas do aspirado medular. Dezesete pacientes

obtiveram pesquisa direta de parasitos positiva, e apenas um paciente apresentou pesquisa direta negativa, mas foi incluído devido à clínica compatível com a de LV. Além disso, o material coletado do aspirado medular de todos os pacientes foi enviado para o cultivo de formas promastigotas do parasito em cultura NNN (Novy-Mc Neal-Nicolle). No entanto, nem todos os pacientes obtiveram culturas positivas.

A LV apresentou-se sintomática pela primeira vez em nove pacientes (50%), foi simultânea à descoberta do HIV-1 em dois (11,1%) e fruto de recidivas em sete pacientes (38,9%). É importante ressaltar que dentre os nove pacientes cuja LV foi o primeiro episódio ativo, todos já apresentavam a infecção pelo HIV-1.

Os casos de LV/HIV-1 ativos foram tratados com antimoniato de N-metil glucamina em três pacientes, sendo que por terem apresentado reação adversa, o tratamento foi substituído por anfotericina B deoxicolato. Em um deles o tratamento ainda foi substituído pela anfotericina B lipossomal. A anfotericina B deoxicolato foi utilizada como droga de primeira escolha em quatorze pacientes. Apenas um caso recebeu a formulação lipídica da anfotericina como primeiro tratamento para a LV. Treze pacientes fazem uso de profilaxia secundária (72,2%) com anfotericina B num intervalo de quinze em quinze dias.

Do total de pacientes coinfectados LV/HIV-1 que foram avaliados na fase pós-tratamento (n =12, sendo sete prospectivos e cinco avaliados apenas no pós-tratamento), três apresentaram recidivas (reativação da leishmaniose) em um intervalo de menos de oito meses após a descontinuidade da terapêutica específica (variação de quatro a oito meses pós-tratamento). Os três pacientes que reativaram a LV faziam uso de quimioprofilaxia secundária para a leishmaniose visceral.



**Tabela 3.** Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1(LV/HIV-1).

<b>Características</b>	<b>Freq (n)</b>	<b>%</b>
<b>Idade em anos</b>		
20 – 40	10 (18)	55,6
41 – 65	8 (18)	44,4
<b>Sexo</b>		
Masculino	14 (18)	77,8
Feminino	4 (18)	22,2
<b>Categoria de exposição ao HIV-1</b>		
Contato sexual	15 (18)	83,3
Usuário de drogas injetáveis	3 (18)	16,7
<b>Linfócitos T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (mediana)</b>		
< 200 células/mm <sup>3</sup>	16 (18)	88,9
> 200 células/mm <sup>3</sup>	2 (18)	11,1
<b>Diagnóstico da leishmaniose</b>		
Pesquisa direta	17 (18)	94,4
Cultura em meio NNN	15 (18)	83,3
<b>Tratamento dos LV/HIV ativos</b>		
Antimonial	3 (18)	16,7
Anfotericina B	14 (18)	77,7
Anfotericina lipossomal	1 (18)	5,6
<b>Profilaxia secundária</b>	13 (18)	72,2
<b>Recidivas</b>	3 (18)	16,7

### **5.8.2 Quantificação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e dos níveis plasmáticos do HIV-1 nos pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1)**

A avaliação quantitativa do grau de comprometimento do sistema imune nos pacientes coinfectados foi realizada pela contagem absoluta dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. Esta foi realizada para os 18 pacientes LV/HIV-1, dos quais 13 estavam na fase ativa da doença e 12 em remissão clínica. As contagens linfocitárias dos sete pacientes LV/HIV-1 ativos que foram acompanhados até a remissão clínica também estão incluídas no gráfico, representadas pelas mesmas cores (Figura 1A). Os resultados foram expressos como mediana e intervalo interquartil (IQR: 25% - 75%) e o teste estatístico utilizado foi o não-paramétrico, Kruskal-Wallis.

Verificou-se que independente da fase clínica da leishmaniose visceral, os pacientes apresentaram valores medianos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> < 200 linfócitos/mm<sup>3</sup> (ativo - mediana: 76 células/mm<sup>3</sup> [IQR: 40 a 130 céls/mm<sup>3</sup>] e pós-tratamento - mediana: 185 células/mm<sup>3</sup> [IQR: 100 a 328 céls/mm<sup>3</sup>]). Entretanto, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa entre esses dois momentos clínicos, foi possível observar que alguns pacientes do acompanhamento prospectivo apresentaram valores um pouco mais altos no pós-tratamento (pós-tto) quando comparados à fase ativa da LV (Figura 1A).

As contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos pacientes de LV, sem infecção pelo HIV-1 também foram realizadas e apresentaram valores abaixo da faixa de normalidade (sadios - 1084 céls/mm<sup>3</sup> [IQR: 926 a 1260 céls/mm<sup>3</sup>]), porém superiores aos dos coinfectados, tanto na fase ativa quanto no pós-tratamento (p<0,05).

Em relação aos indivíduos infectados pelo HIV-1, sem leishmaniose, foram observados níveis de células T CD4<sup>+</sup> superiores (mediana – 371 céls/mm<sup>3</sup> [IQR: 146 a 543 céls/mm<sup>3</sup>]) àqueles encontrados nos pacientes coinfectados LV/HIV-1, apenas na fase ativa da doença.

No que se refere à contagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, foram observados valores significativamente mais baixos destas células nos pacientes coinfectados ativos (mediana: 293 céls/mm<sup>3</sup> [IQR:212 a 657 céls/mm<sup>3</sup>]) em relação aos casos nos pós-tratamento (mediana: 496 céls/mm<sup>3</sup> [IQR: 383 a 1064 céls/mm<sup>3</sup>] – Figura 1B).

Diferente do que ocorreu para a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, os pacientes de LV, sem infecção pelo HIV, não apresentaram diferenças significativas nos níveis de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em relação aos pacientes de LV/HIV-1 ativos e no pós-tratamento

(Figura 1B). No entanto, diferenças na contagem absoluta desta subpopulação de linfócitos, entre os pacientes de coinfeção LV/HIV-1 e os casos de HIV-1 foram verificadas (Figura 1B). A mediana das contagens absolutas dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi de 533 céls/mm<sup>3</sup> (IQR: 427 a 741 céls/mm<sup>3</sup>) nos indivíduos sadios.

Considerando que as contagens absolutas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem ser influenciadas pela intensa atividade de replicação viral, seja direta ou indiretamente, fomos avaliar se havia uma correlação entre os níveis plasmáticos de HIV-1 (carga viral) e os níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos pacientes coinfectados nos dois momentos de evolução da doença. As Figura 1C e D mostram essa relação nos pacientes LV/HIV-1 na fase ativa (Figura 1C) e no pós-tratamento anti-*Leishmania* (Figura 1D). Os pacientes avaliados longitudinalmente são mostrados por cores idênticas nos gráficos.

A carga viral foi quantificada em 11 pacientes de LV/HIV-1 em atividade e em 11 casos de LV/HIV-1 após o tratamento (Figura 1 C e D). Cinco pacientes coinfectados com doença ativa apresentaram níveis indetectáveis do vírus. Em apenas um caso, os níveis de carga viral foram baixos, compreendidos na faixa entre 50 – 10.000 cópias/mL, sendo que o valor máximo detectado foi de 1.142 cópias/mL. Finalmente, cinco pacientes apresentaram níveis de RNA viral acima de 10.000 cópias/mL. Após o tratamento específico para a LV, quando todos os pacientes já estavam sob o uso da TARV, (incluindo aquele cuja LV e a infecção pelo HIV-1 foram diagnosticadas simultaneamente e aqueles cuja TARV foi reiniciada com a terapia anti-*Leishmania*), foram observadas importantes modificações. Nenhum paciente se encontrava com carga viral acima de 10.000 cópias/mL. Apenas três casos apresentaram carga viral entre 50 - 10.000 cópias/mL, sendo que um deles diminuiu intensamente sua carga viral. Por fim, em oito pacientes coinfectados a carga viral foi abaixo de 50 cópias/mL, incluindo um paciente do acompanhamento prospectivo que se encontrava com carga viral entre 50-10.000 cópias na fase ativa da doença.

Esses dados mostram que a maioria dos pacientes apresentou uma supressão viral importante, provavelmente associada a uma boa resposta à TARV. Não foi observada correlação entre os níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e a carga viral, uma vez que independente de baixos níveis ou até mesmo de uma carga viral indetectável (< 50 cópias/mL), os pacientes permaneceram com valores de linfócitos T CD4<sup>+</sup> < 200 células/mm<sup>3</sup>, independente da fase clínica da leishmaniose em que se encontravam. Tal fato é mais notável entre os mesmos pacientes que foram avaliados antes e após o tratamento (Figura

1C e D). A exceção foi verificada em três pacientes LV/HIV-1 no pós-tto, cujos níveis de T CD4<sup>+</sup> foram acima de 200 células/mm<sup>3</sup>. Estes dados podem sugerir que na associação LV/HIV-1 os baixos níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> não estão apenas associados à atividade replicativa do HIV-1 na periferia. Além disso, pode-se sugerir que da mesma maneira como ocorre em outras coinfeções, seja necessário um período de tempo maior para a recuperação desses valores de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

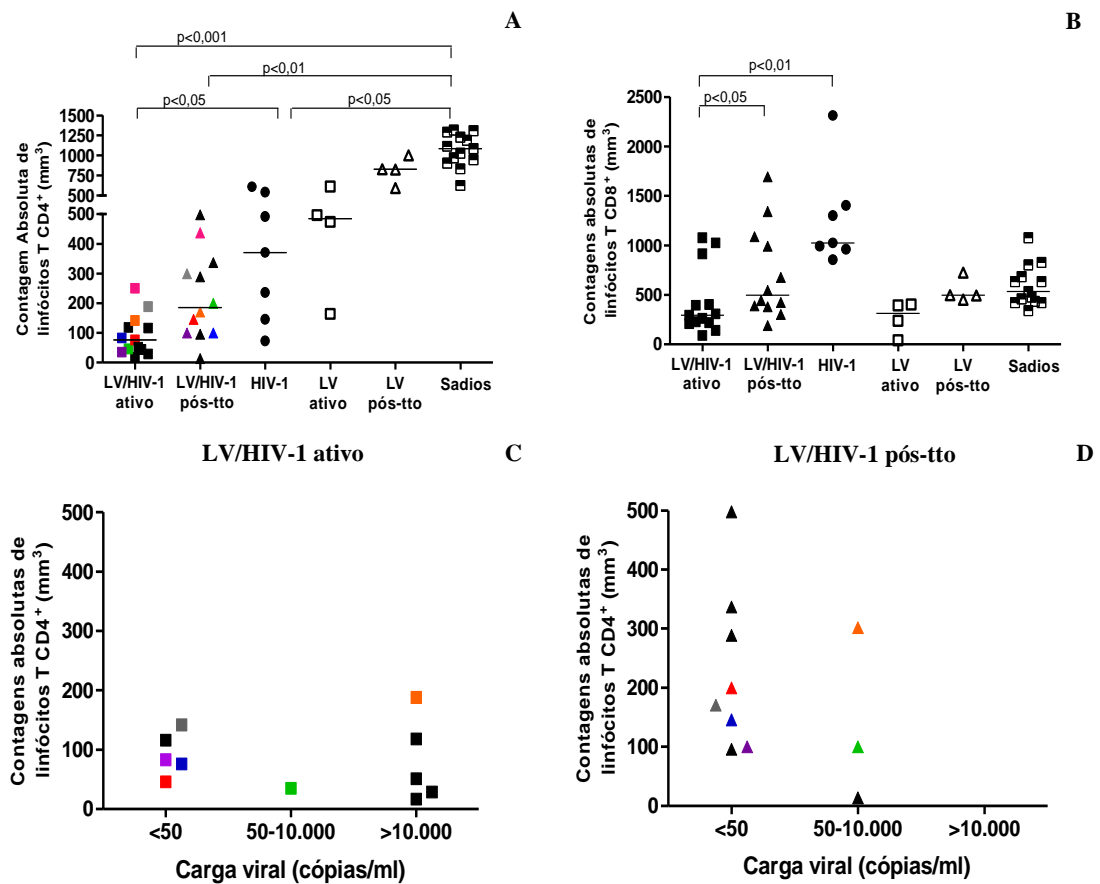


Figura 1. Avaliação dos parâmetros laboratoriais e virais dos pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1). (A) Contagem absoluta das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e (B) T CD8<sup>+</sup>. (C e D) Relação entre o número de cópias de RNA de HIV-1 plasmático e contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos pacientes LV/HIV-1 na doença ativa (C) e no pós-tratamento (D). Foram avaliados pacientes de leishmaniose (LV), negativos para o HIV, na fase de doença ativa e após o tratamento (pós-tto), bem como, casos de HIV-1, sem leishmaniose e indivíduos saudáveis. As barras horizontais representam a mediana dos valores.

### **5.8.3 Avaliação do grau de senescência replicativa dos linfócitos T de sangue periférico em pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1)**

Inicialmente, o grau de imunosenescência nos pacientes coinfectados foi avaliado qualitativamente através da determinação do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> apresentando a molécula CD57 (Figura 2A e B). Em seguida, determinou-se o percentual de células senescentes (CD57<sup>+</sup>), porém já completamente diferenciadas (perderam a expressão de CD27). A presença desta molécula (CD57) numa frequência acima do esperado para a idade cronológica vista em comparação aos controles sadios, será indicativa da ocorrência do fenômeno.

Os pacientes LV/HIV-1 apresentaram níveis mais elevados de senescência replicativa em T CD4<sup>+</sup> (ativo - mediana: 7,8% [IQR: 6,2% a 15%], pós-tratamento – mediana: 9,6% [IQR: 5,1% a 15%]) quando comparados aos indivíduos sadios (mediana: 4,7% [IQR: 2,1% a 5,1%]) (Figura 2A). Apenas oito indivíduos sadios foram avaliados, pois foram incluídos somente aqueles com idades semelhantes aos dos pacientes coinfectados (mediana – 36 anos). Não foram encontradas diferenças significativas entre a fase ativa e de pós-tratamento entre os pacientes coinfectados, bem como quando comparado aos casos de HIV-1, sem leishmaniose.

De modo interessante, o percentual de células T CD4<sup>+</sup> senescentes foi significativamente mais alto nos pacientes coinfectados durante a fase ativa da doença em comparação aos pacientes de LV, sem HIV-1, no mesmo momento clínico (mediana: 2,5% [IQR: 2,3% a 3%]). No entanto, após o tratamento os níveis de senescência tenderam a aumentar e não se observou mais diferença significativa em relação aos pacientes de LV pós-tratamento (Figura 2A).

As mesmas observações foram encontradas para os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, embora seja notável o maior percentual de senescência replicativa nesta subpopulação (Figura 2B).

No que se refere à análise do percentual de células CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> nos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, os pacientes LV/HIV-1 permaneceram com valores medianos de células senescentes superiores (ativo - mediana: 4,1% [IQR: 3,1% a 5,3%], pós-tratamento – mediana: 3,3% [IQR: 1,7% a 4,7%]) aos indivíduos sadios (ativo - mediana: 1,9% [IQR: 0,8% a 2,1%]). No entanto, sem diferenças significativas entre os dois momentos clínicos avaliados e em relação aos casos de HIV-1 apenas (mediana: 2,7% [IQR: 2% a 15%]). O percentual de células CD57<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> também permaneceu mais elevado nos pacientes

LV/HIV-1 ativos em relação aos casos de LV, sem HIV-1 na mesma fase clínica (Figura 2C). Em relação à subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> foram verificadas as mesmas diferenças (Figura 2D).

Além disso, conforme apontado acima, o percentual de células CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> na população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> é significativamente mais elevado do que o observado na subpopulação de T CD4<sup>+</sup> (Figura 2E). Tal achado também é verdadeiro para os demais grupos avaliados (Figura 2E).

É interessante observar que entre os pacientes LV/HIV-1, mais da metade do percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> que expressam CD57<sup>+</sup>, (Figura 2B) já coexpressam o fenótipo de célula diferenciada, independente da fase clínica (Figura 2D). A figura 2F mostra que o percentual de células senescentes em estágio final da diferenciação (CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) é significativamente mais elevado do que o percentual de células CD57<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, sugerindo que conforme as células avançam nas etapas da diferenciação celular, a senescência replicativa aumenta.

Por fim, verificamos uma correlação positiva entre o percentual de células CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> na subpopulação T CD4<sup>+</sup> e as contagens absolutas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em todos os grupos de pacientes infectados pelo HIV-1 (coinfectados ativos, pós-tto e HIV-1, sem leishmaniose) (Figura 2G), sugerindo que quanto maior o percentual de imunosenescência, maior a depleção de células T CD4<sup>+</sup> nesses indivíduos.

Não foi observada nenhuma correlação entre o percentual de células senescentes e a carga viral, uma vez que a maioria dos indivíduos coinfectados apresentaram cargas virais indetectáveis (abaixo de 50 cópias/mL, Figura 1C e D), porém percentuais de células CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> similares àqueles com cargas virais elevadas (dados não mostrados).

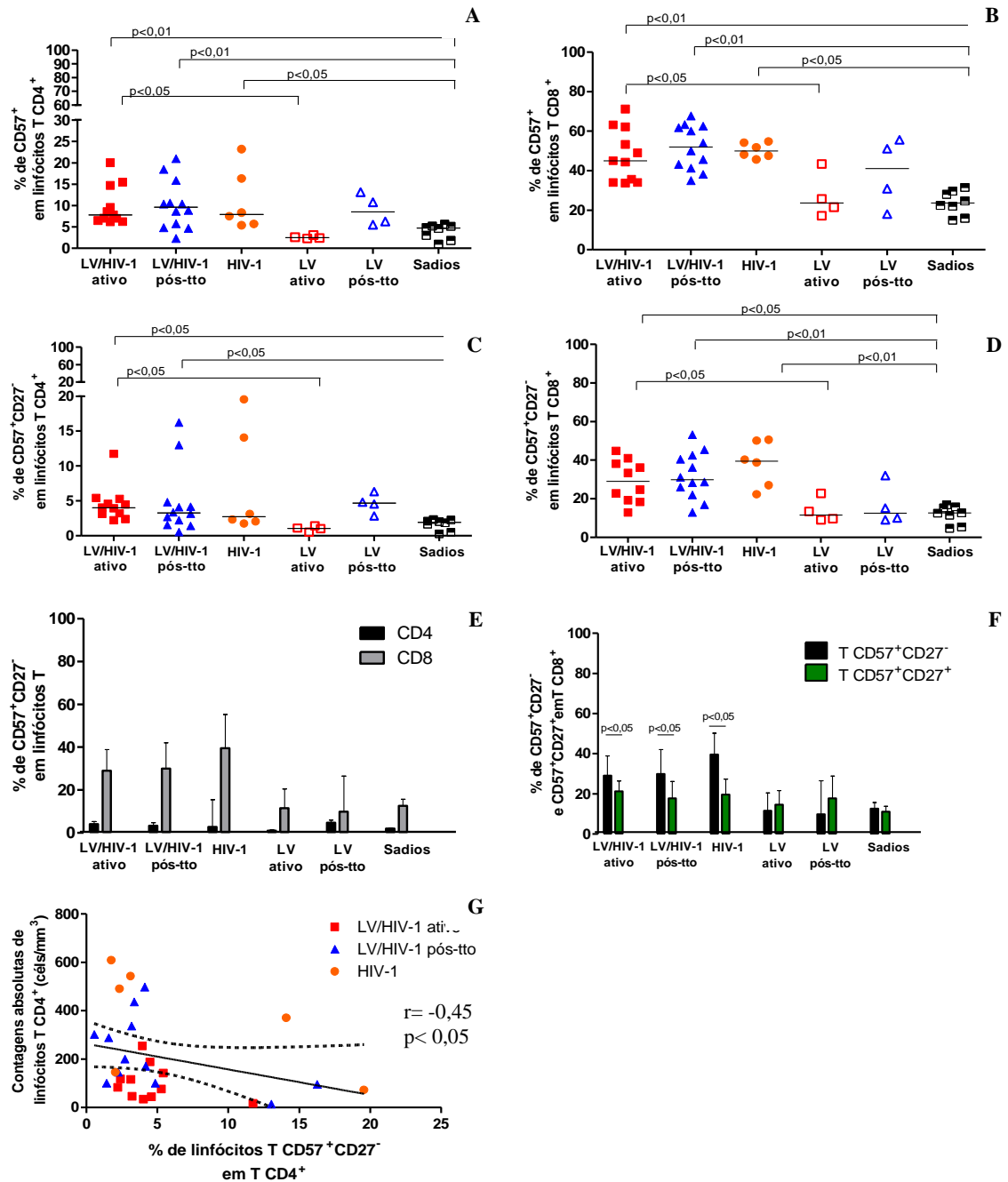


Figura 2. Avaliação do grau de senescência replicativa nos pacientes coinfetados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1). Percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A) e T CD8<sup>+</sup> (B) expressando a molécula CD57. Percentual de células CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> em T CD4<sup>+</sup> (C) e em T CD8<sup>+</sup> (D). Comparação entre o percentual de células CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> em T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (E) e entre CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> e CD57<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> em T CD8<sup>+</sup> (F). Correlação entre o percentual de células senescentes e as contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (G). Foram avaliados pacientes de LV, negativos para o HIV-1, na fase ativa e após o tratamento (pós-tto), bem como, casos de HIV-1, sem leishmaniose e indivíduos saudáveis. As linhas horizontais representam a mediana dos valores.

Resultados preliminares em pacientes acompanhados desde a fase ativa da doença até a remissão clínica (oito meses após o tratamento anti-*Leishmania*) revelaram que o percentual de células senescentes parece aumentar longo tempo após o tratamento específico para LV, conforme observado para Pt1 e Pt2 em T CD4<sup>+</sup> e em T CD8<sup>+</sup> (Figura 3A e B). Na verdade, os três pacientes parecem manter níveis elevados de senescência em T CD8<sup>+</sup> por todo o período avaliado. Esses três pacientes apresentaram um incremento nas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ao longo desses três momentos clínicos (ativo, pós-tto e remissão clínica), porém apenas Pt1 alcançou contagens acima de 350 células/mm<sup>3</sup> na remissão clínica, enquanto Pt2 e Pt3 permaneceram com contagens abaixo de 250 células/mm<sup>3</sup>.

Os pacientes Pt4 e Pt5 apresentaram um episódio de recidiva da LV na remissão clínica, mas precisamente, com sete e cinco meses pós-tratamento anti-*Leishmania*, respectivamente. Apesar de terem a recidiva em comum, seus resultados mostraram resultados conflitantes (Figura 3A e B). O percentual de células senescentes durante a recidiva estava mais elevada em T CD4<sup>+</sup> e em T CD8<sup>+</sup> em Pt4. O contrário ocorreu em Pt5. Isso pode ter acontecido em função do fato de Pt4 não estar sob uso de TARV no momento da admissão do protocolo de estudo (fase ativa da LV), porém ambos Pt4 e Pt5 já estavam sob uso regular de TARV no momento da recidiva.

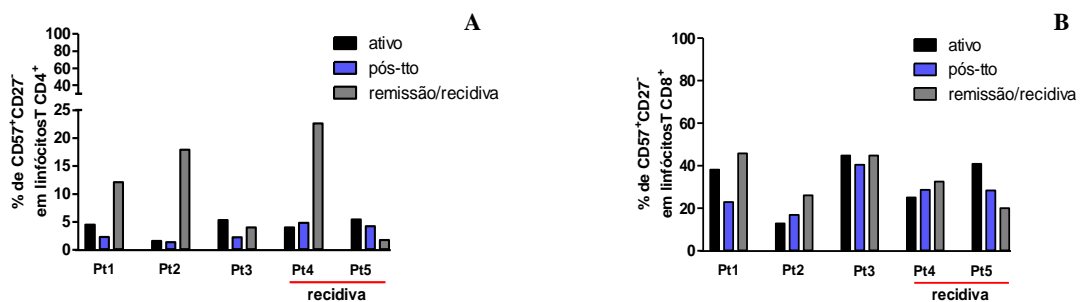


Figura 3. Avaliação do grau de senescência replicativa em cinco pacientes de coinfetados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1) de acompanhamento longitudinal. Percentual de células CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> em T CD4<sup>+</sup> (A) e em T CD8<sup>+</sup> (B). Os pacientes LV/HIV-1 foram avaliados na fase ativa, logo após o tratamento e na remissão clínica (oito meses após o tratamento específico). A barra vermelha indica os dois pacientes que apresentaram um episódio de reativação da LV com seis meses de remissão clínica.



Além dos resultados *ex vivo*, a senescência replicativa também está sendo investigada após a estimulação das células *in vitro* com os antígenos específicos de *L. infantum* (Li) e p24 do HIV-1. Resultados preliminares de apenas três pacientes revelaram que da mesma maneira como ocorre *ex vivo*, o percentual de células CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> *in vitro* é maior na subpopulação T CD8<sup>+</sup> quando comparado aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 4A e B). Além disso, o percentual de células senescentes nos pacientes LV/HIV-1 durante a fase ativa da doença (*ex vivo*) não difere significativamente das células não estimuladas utilizadas como controle (BG- *background*), em ambas subpopulações de linfócitos T.

O percentual de células T CD4<sup>+</sup> que expressam CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> frente ao estímulo de Li é mais elevado quando comparado àquelas não estimuladas, na fase pós-tratamento. Nenhuma diferença significativa foi observada frente ao Ag-p24 (Figura 4A). De acordo com os resultados de senescência replicativa *ex vivo* na população de células T CD8<sup>+</sup>, o percentual de células CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> frente aos estímulos antigênicos específicos (Li e p24) não diferem daqueles observados na ausência do estímulo, ou mesmo diminui ao longo do período acompanhado (Figura 4B). Os cinco indivíduos sadios avaliados não apresentaram nenhuma diferença no percentual de CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> em T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> frente aos mesmos antígenos (dados não mostrados).

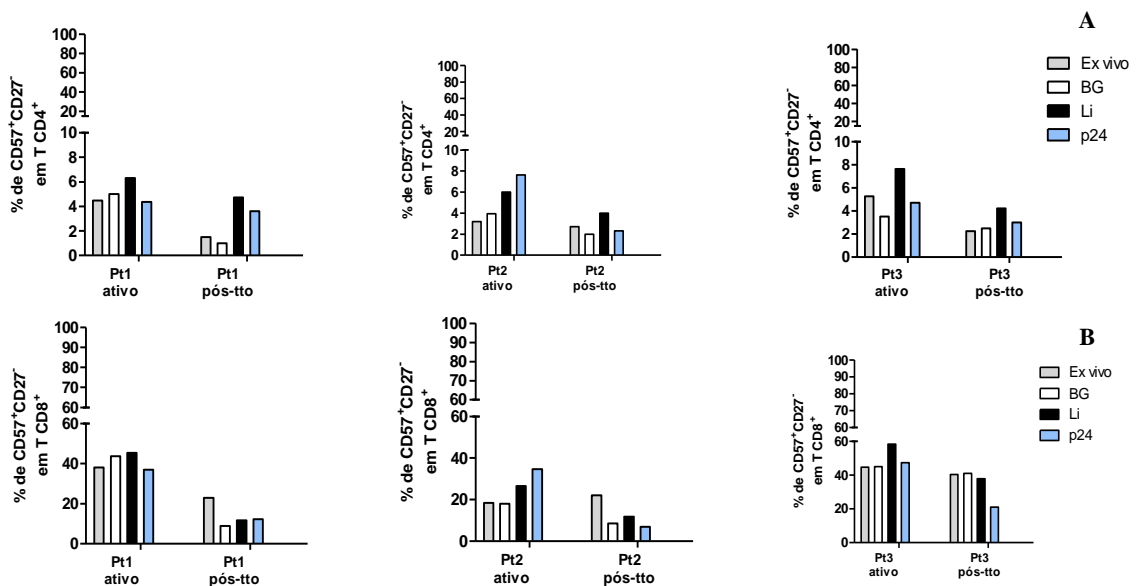


Figura 4. Avaliação do grau de senescência replicativa *in vitro* frente aos estímulos de *Leishmania (Leishmania) infantum* (Li) e HIV-1 (p24) em três pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1) avaliados na fase ativa da LV e logo após o tratamento. Percentual de células CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> em T CD4<sup>+</sup> (A) e em T CD8<sup>+</sup> (B). BG – poço contendo apenas células, sem estímulo antigênico.

#### 5.8.4 Avaliação do perfil de distribuição das famílias V $\beta$ do TCR em pacientes coinfetados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1)

Com o intuito de investigar o perfil detalhado de distribuição do repertório de linfócitos T nos indivíduos acometidos por ambas as enfermidades (LV/HIV-1), ao lado da influência da administração da TARV e do tratamento específico para *Leishmania*, inicialmente analisamos a utilização desses segmentos V da cadeia beta do repertório TCR em indivíduos saudáveis e naqueles monoinfectados com LV ou HIV-1 apenas. Além disso, esta análise inicial do repertório dos linfócitos T nos permitirá investigar se ocorre alguma mobilização diferencial na coinfeção LV/HIV-1. O perfil de distribuição das 24 famílias V $\beta$  foi avaliado nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> separadamente. Os resultados foram expressos como mediana e intervalo interquartil (IQR: 25% - 75%), isto é, os gráficos mostram os valores percentuais medianos e o IQR de células T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> expressando uma determinada cadeia V $\beta$ .

Em relação aos treze indivíduos saudáveis analisados, observamos que alguns segmentos V $\beta$  foram expressos por mais de 5% das células T CD4<sup>+</sup>, como V $\beta$ 2, V $\beta$ 8 e V $\beta$ 17 (Figura 5A), destacando-se o V $\beta$ 2 como a cadeia mais utilizada pelas células T CD4<sup>+</sup> dos saudáveis. Além disso, também verificamos maior utilização das famílias V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 11, V $\beta$ 12, V $\beta$ 13.1 e V $\beta$ 13.6 na subpopulação T CD4<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ) e das famílias V $\beta$ 14 e V $\beta$ 23 nas células T CD8<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ).

Por outro lado, algumas cadeias foram utilizadas por menos de 1% das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, como V $\beta$ 4, V $\beta$ 11, V $\beta$ 18 e V $\beta$ 23, sendo que as famílias V $\beta$ 11 e V $\beta$ 23, mesmo sendo pouco mobilizadas, ainda estavam presentes em percentuais maiores nas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, respectivamente ( $p < 0,05$ , Figura 5A). De modo geral, as 24 cadeias foram expressas nas células T dos indivíduos saudáveis, com destaque para V $\beta$ 4, cuja frequência mediana de células expressando essa família foi menor do que 1% nas duas subpopulações. Esses resultados sugerem que não há uma distribuição completamente aleatória, mas sim uma tendência de utilização de determinadas famílias V $\beta$  pelas células T, com algumas sendo mais expressas em T CD4<sup>+</sup> e outras em T CD8<sup>+</sup> (Figura 5A).

A avaliação do repertório do TCRV $\beta$  também foi realizada em seis indivíduos infectados pelo HIV-1, sem leishmaniose, os quais se encontravam em uso regular de TARV por no mínimo um ano, com cargas virais baixas ou indetectáveis (variação de indetectável a 9500 cópias/mL) e contagem mediana de T CD4<sup>+</sup> de 431 células/mm<sup>3</sup>, (IQR

- 128-560 células/mm<sup>3</sup>). As frequências de utilização das famílias V $\beta$  nas subpopulações de linfócitos T nesses indivíduos infectados pelo HIV-1 foram inicialmente comparadas aos indivíduos saudáveis, de modo a identificar possíveis alterações no percentual de células expressando determinadas famílias frente à infecção (Figura 5B).

De um modo geral, observamos que todas as 24 famílias foram utilizadas pelas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> desses pacientes HIV-1, com algumas alterações em relação ao grupo de indivíduos saudáveis ( $p < 0,05$ ), entre elas, duas famílias que se apresentaram reduzidas em T CD4<sup>+</sup> (V $\beta$ 2 e V $\beta$ 7.2) e três em T CD8<sup>+</sup> (V $\beta$ 7.2, V $\beta$ 11 e V $\beta$ 20). As famílias cuja utilização se diferenciou daquela observada anteriormente para os saudáveis são apresentadas na Figura 5B pelo asterisco azul, conforme a legenda.

Por outro lado, verificou-se que algumas famílias V $\beta$  apresentaram o mesmo padrão de mobilização observado para os indivíduos saudáveis, com V $\beta$ 2, V $\beta$ 8 e V $\beta$ 17 também sendo utilizados por mais de 5% das células T CD4<sup>+</sup>. Entretanto, diferente dos saudáveis, o V $\beta$ 8 também foi utilizado por mais de 5% das células T CD8<sup>+</sup>. As cadeias V $\beta$ 4, V $\beta$ 11, V $\beta$ 18 e V $\beta$ 23 também foram utilizadas por menos de 1% das células T nas duas subpopulações (Figura 5B).

As diferenças de utilização das cadeias V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 12 e V $\beta$ 13.1 entre as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, também observadas para os indivíduos saudáveis (Figura 5A), permaneceram significativas ( $p < 0,05$ ) nos casos de HIV-1. No entanto, outras famílias começaram a se destacar frente à infecção pelo HIV-1, como o V $\beta$ 3, o qual foi expresso por cerca de 9% das células T CD8<sup>+</sup> e o V $\beta$ 17 e V $\beta$ 20 que foram mais utilizados pelas células T CD4<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ). A família V $\beta$ 3 em T CD8<sup>+</sup> também foi significativamente mais utilizada pelos casos de HIV-1 quando comparado aos saudáveis ( $p < 0,05$ ).

Por fim, o repertório de linfócitos T também foi avaliado em quatro casos de LV, sem infecção pelo HIV-1, durante a fase ativa e após o tratamento (cerca de até seis meses depois). A análise mostrou que alguns segmentos V $\beta$  foram utilizados por mais de 5% das células T CD4<sup>+</sup>, tais como: V $\beta$ 2, V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 8 e V $\beta$ 17, independente da fase clínica em que os pacientes se encontravam (Figura 5C). Além dessas famílias, V $\beta$ 1, V $\beta$ 7.1, V $\beta$ 13.2, V $\beta$ 20 e V $\beta$ 22 também foram observadas em um percentual mediano maior do que 5% no repertório de T CD4<sup>+</sup> dos pacientes de LV ativos, com destaque para V $\beta$ 1, V $\beta$ 7.1, V $\beta$ 13.2 e V $\beta$ 17 que foram mais utilizadas na fase ativa quando comparadas à fase pós-tratamento ( $p < 0,05$ ).

Em relação ao repertório nos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, o percentual mediano de nove segmentos Vβ ultrapassou 5% de utilização na fase ativa da LV (Figura 5D). Da mesma maneira que para os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, alguns segmentos também foram mais utilizados no repertório de T CD8<sup>+</sup> na fase ativa da doença quando comparados à fase pós-tratamento, são eles: Vβ4, Vβ7.2, Vβ17, Vβ20 e Vβ21.3. O percentual mediano de mobilização foi menor do que 1% para as cadeias Vβ4 e Vβ7.2 no pós tratamento para *Leishmania*.

É importante destacar que o número de famílias que são utilizadas por mais de 5% das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no repertório dos pacientes de LV (Figura 5C e D) é bem mais elevado quando comparado aos indivíduos sadios (Figura 5A) e aos casos de HIV-1 (Figura 5B). O mesmo também ocorre para aquelas com percentual de utilização mediano entre 1 e 5% nas duas subpopulações de linfócitos T, apontando para a intensa dinâmica de mobilização no repertório dos linfócitos T na LV. Tal fato pode ser especialmente observado na fase ativa da LV, declinando na fase pós-tratamento.

Além disso, quando o perfil geral de utilização dos segmentos Vβ em T CD4<sup>+</sup> e em T CD8 dos casos de LV foi comparado aos sadios, verificamos que apenas duas famílias permaneceram significativamente mais mobilizadas nos pacientes de LV no pós-tratamento. São elas, Vβ2 e Vβ18 em T CD4<sup>+</sup> e Vβ8 e Vβ18 em T CD8<sup>+</sup>, o que pode indicar um retorno do uso normal das cadeias Vβ após a quimioterapia bem-sucedida. Diferentemente, conforme mostrado na figura 5C e D, várias alterações significativas foram observadas na distribuição do repertório entre os pacientes de LV ativos e os sadios nas duas subpopulações de linfócitos T ( $p < 0,05$ ). Cerca de seis segmentos Vβ encontravam-se expandidos no repertório de T CD4<sup>+</sup> e em T CD8<sup>+</sup> na fase ativa da doença da LV quando comparados aos sadios (Figura 5C e D).

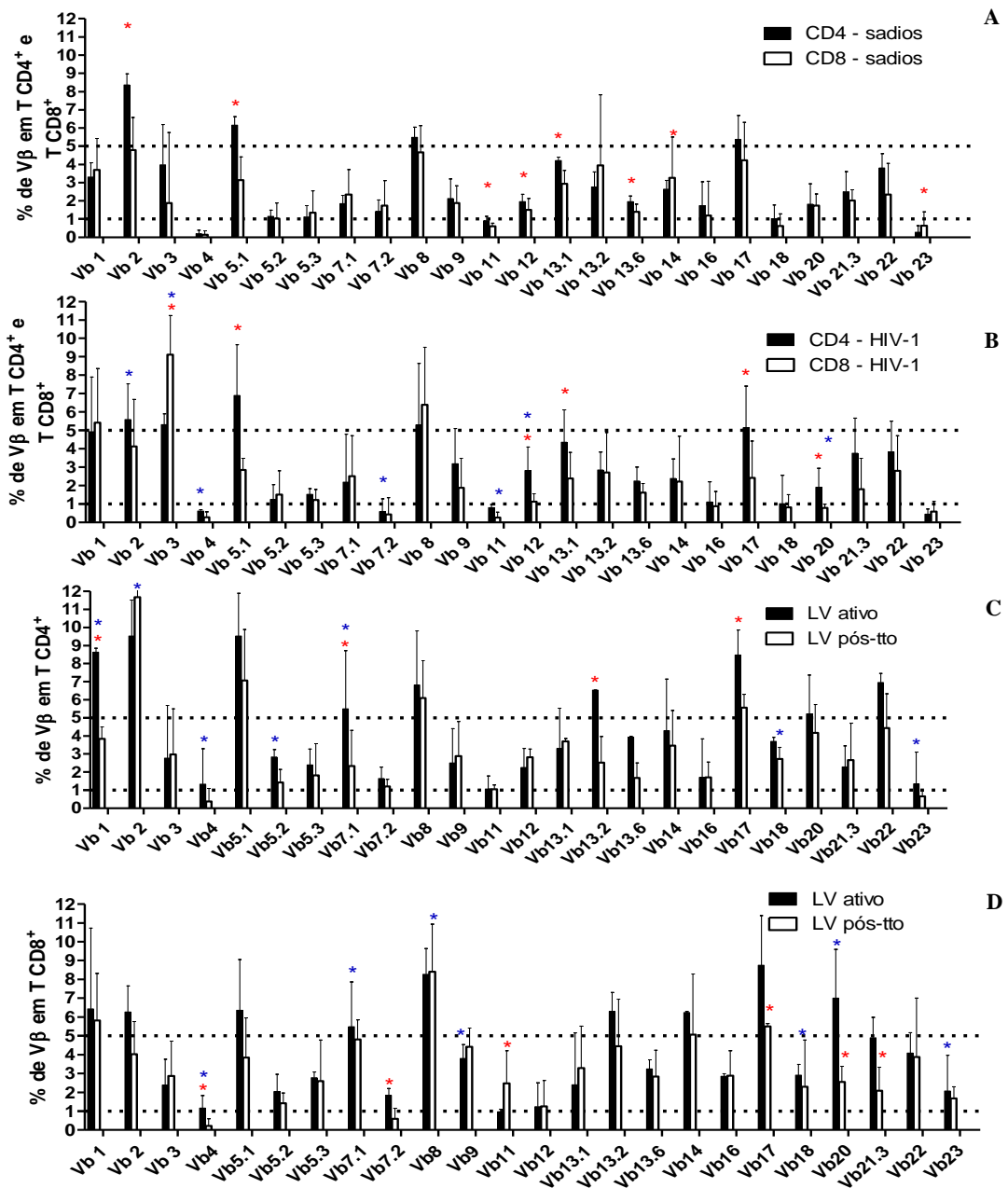


Figura 5. Percentuais medianos de utilização das 24 famílias V $\beta$  nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> nos indivíduos saudáveis (A), nos pacientes infectados pelo HIV-1, sem leishmaniose visceral (B) e nos pacientes de leishmaniose visceral (LV) negativos para HIV-1, na fase ativa e no pós-tratamento *anti-Leishmania* (C e D). As barras representam a mediana dos valores com os respectivos intervalos interquartis. As linhas pontilhadas representam as medianas de 1% e 5% dos percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que expressam uma determinada família V $\beta$ . \* comparações entre as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que expressam um determinado V $\beta$  em (A) e (B) e entre a fase ativa e pós-tto dos pacientes de LV em (C) e (D). \* comparações entre as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que expressam um determinado V $\beta$  em relação aos indivíduos saudáveis. \* p<0,05.

Finalmente, conforme descrito na seção anterior, a análise do perfil de distribuição do TCRV $\beta$  foi realizada em 13 pacientes coinfectados na fase ativa da doença e em 12 no pós-tratamento para *Leishmania*, dos quais sete são os mesmos indivíduos avaliados desde a fase ativa da LV.

Em relação à subpopulação de células T CD4<sup>+</sup>, observamos que as cadeias V $\beta$ 1, V $\beta$ 2, V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 8 e V $\beta$ 13.2 foram expressas por mais de 5% dessas células independente da fase clínica da LV (Figura 6A). As famílias V $\beta$ 2, V $\beta$ 5.1 e V $\beta$ 8 também foram as mais mobilizadas no repertório de T CD4<sup>+</sup> entre os casos de HIV-1 (Figura 5B). Ao mesmo tempo, V $\beta$ 1 e V $\beta$ 13.2 também foram as mais utilizadas pelos pacientes controles de LV ativos (Figura 5C). Por outro lado, a frequência mediana de mobilização de algumas cadeias não ultrapassou 1% das células T CD4<sup>+</sup>, tais como o V $\beta$ 7.2 e V $\beta$ 16 nos pacientes LV/HIV-1 na fase ativa da doença e as famílias V $\beta$ 4, V $\beta$ 7.2, V $\beta$ 11 e V $\beta$ 23 nos pacientes LV/HIV-1 no pós-tratamento (Figura 6A). Novamente, conforme observado para os casos apenas de HIV-1, as cadeias V $\beta$ 4, V $\beta$ 7.2, V $\beta$ 11 e V $\beta$ 23 também foram menos utilizadas pelo repertório TCRV $\beta$  em T CD4<sup>+</sup>. Além disso, os pacientes de LV, sem HIV-1, também permaneceram com um percentual mediano de expressão da família V $\beta$ 4 abaixo de 1% no pós-tratamento. Esses resultados nos sugerem que o repertório dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> parece refletir de maneira bastante similar o que ocorre nas monoinfecções com HIV-1 ou *L.infantum* separadamente (Tabela 4).

As demais cadeias foram expressas por pelo menos 1 a 5% das células T CD4<sup>+</sup> em todos os pacientes coinfectados, sugerindo a participação de todas as cadeias avaliadas na formação do repertório desses pacientes (Figura 6A), apesar das baixas contagens de células T CD4<sup>+</sup> nesse grupo. Algumas famílias parecem ser mais utilizadas pelas células T CD4<sup>+</sup> de pacientes coinfectados durante a fase ativa da LV, conforme mostrada na Figura 6A ( $p < 0,05$ ).

No que se refere ao repertório TCRV $\beta$  na subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, verificamos que apenas a família V $\beta$ 14 foi expressa por mais de 5% dessas células nos pacientes coinfectados ativos (Figura 6B). Todas as demais cadeias foram utilizadas por menos de 5% dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, o que sugere importantes diferenças em relação ao repertório utilizado pelas células T CD4<sup>+</sup> desses pacientes, bem como pelas células T CD8<sup>+</sup> dos pacientes de LV apenas. É interessante observar que a família V $\beta$ 3 apresentou altos intervalos interquartis, uma vez que alguns pacientes expressaram percentuais muito baixos de utilização dessa cadeia. Além disso, o percentual mediano de células T CD8<sup>+</sup>

expressando as cadeias V $\beta$ 4 e V $\beta$ 11 foi irrelevante, independente da fase clínica da LV. A mobilização do V $\beta$ 7.2 também foi muito baixa entre os pacientes no pós-tratamento. Destaca-se também a maior utilização das cadeias V $\beta$ 12 e V $\beta$ 14 pelas células T CD8<sup>+</sup> dos pacientes LV/HIV-1 ativos ( $p < 0,05$ , Figura 6B).

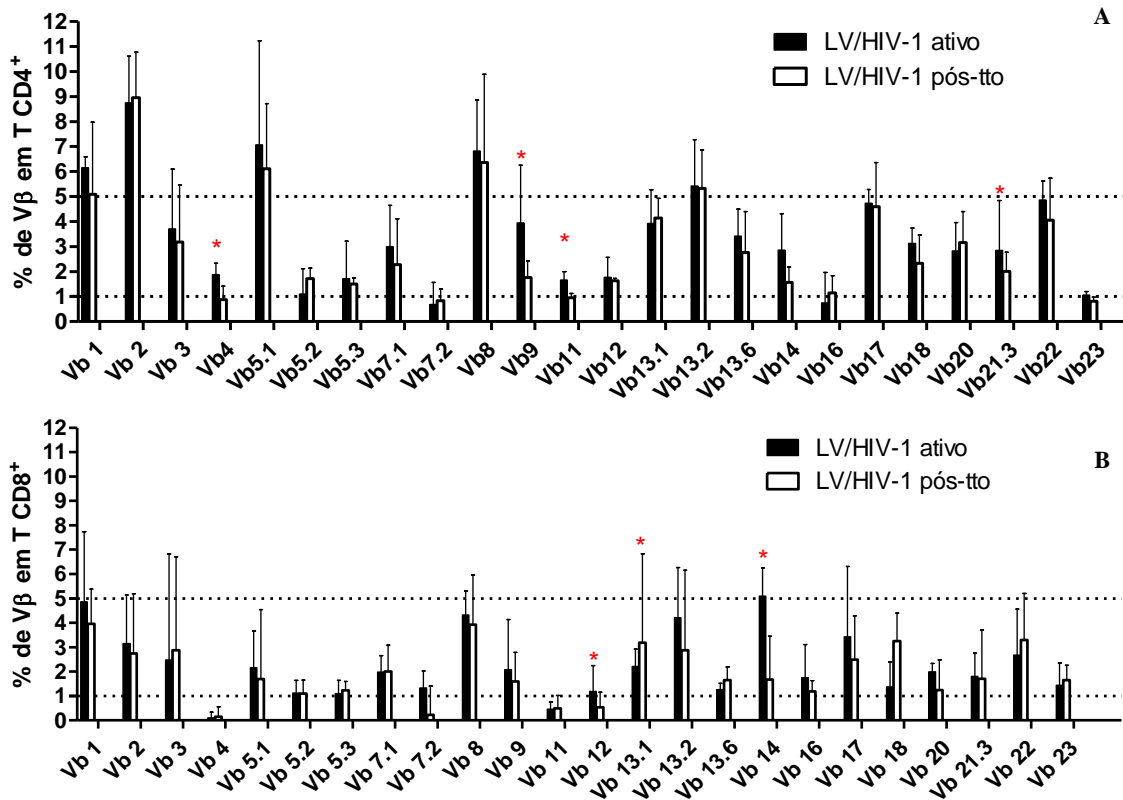


Figura 6. Percentuais medianos de utilização das 24 famílias V $\beta$  nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A) e T CD8<sup>+</sup> (B) nos pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1) na fase ativa e no pós-tratamento anti-*Leishmania*. As barras representam a mediana dos valores com os respectivos intervalos interquartis. A linha pontilhada representa medianas de 1% e 5% dos percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que expressam uma determinada família V $\beta$ . \* comparações entre as fases clínicas dos pacientes coinfectados (ativo e pós-tratamento) nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A) e T CD8<sup>+</sup> (B) que expressam um determinado V $\beta$ . \*  $p < 0,05$ .

Por fim, no intuito de avaliar se algum segmento V $\beta$  utilizado pelo repertório dos pacientes coinfectados era diferencialmente mobilizado, comparamos o perfil de distribuição das 24 famílias V $\beta$  em todos os grupos simultaneamente. De fato, embora algumas famílias mais utilizadas nos casos de monoinfecção de LV e HIV-1

separadamente também participem do repertório dos pacientes LV/HIV-1, algumas diferenças foram encontradas quando outras cadeias incomuns foram comparadas ( $p < 0,05$ ). Em relação ao repertório utilizado pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, verificamos que sete famílias apresentaram diferenças nos seus percentuais medianos de utilização, conforme mostrado na figura 7. De modo geral, Vβ1, Vβ4, foram mais utilizados pelos pacientes de LV/HIV-1 nos dois momentos clínicos quando comparados aos saudáveis, enquanto Vβ13.2 e Vβ18 diferiram apenas na fase ativa da doença. As famílias Vβ7.1 e Vβ17 foram menos utilizadas nos coinfectados ativos em relação aos pacientes de LV na mesma fase clínica. Já Vβ13.2 e Vβ18 foram mais utilizados pelas células T CD4<sup>+</sup> dos pacientes de LV/HIV-1 ativos comparados aos casos de HIV-1. A Tabela 4 resume as similaridades e diferenças encontradas no TCRVβ entre os grupos avaliados neste estudo.

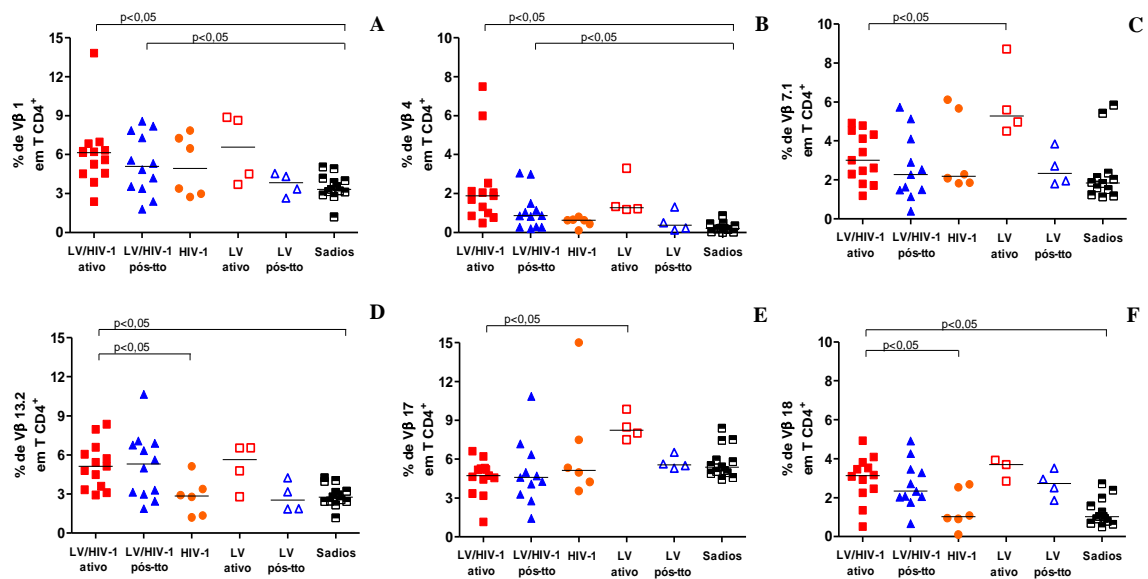


Figura 7. Comparação entre os percentuais medianos de utilização das famílias Vβ na subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos pacientes LV/HIV-1 na fase ativa e no pós-tratamento anti-*Leishmania* com os respectivos grupos de pacientes HIV-1, sem leishmaniose, de LV sem HIV-1 e de indivíduos saudáveis. (A) Vβ1, (B) Vβ4, (C) Vβ7.1, (D) Vβ7.2, (E) Vβ13.2, (F) Vβ17 e (G) Vβ18. As barras representam a mediana dos valores.

O perfil geral de distribuição das famílias Vβ nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentou mais alterações em relação aos demais grupos utilizados para comparação, o que pode estar relacionado com a condição de coinfeção com dois patógenos diferentes simultaneamente. Dez famílias apresentaram perfis de utilizações diferentes por estas



células. Destas últimas, sete foram menos utilizadas pelo repertório de T CD8<sup>+</sup> dos pacientes coinfectados na fase ativa da LV (Vβ2, Vβ4, Vβ5.1, Vβ5.3, Vβ7.1, Vβ13.6 e Vβ17 – Figura 8) em relação aos pacientes de LV, sem HIV-1 na mesma fase clínica. No entanto, apenas Vβ7.1 e Vβ17 continuaram a ser menos utilizados no pós-tratamento, em adição do Vβ8. Conforme descrito anteriormente, Vβ3 se destacou no repertório T CD8<sup>+</sup> dos casos de HIV-1 e, portanto foi mais utilizado quando comparado aos coinfectados na fase ativa.

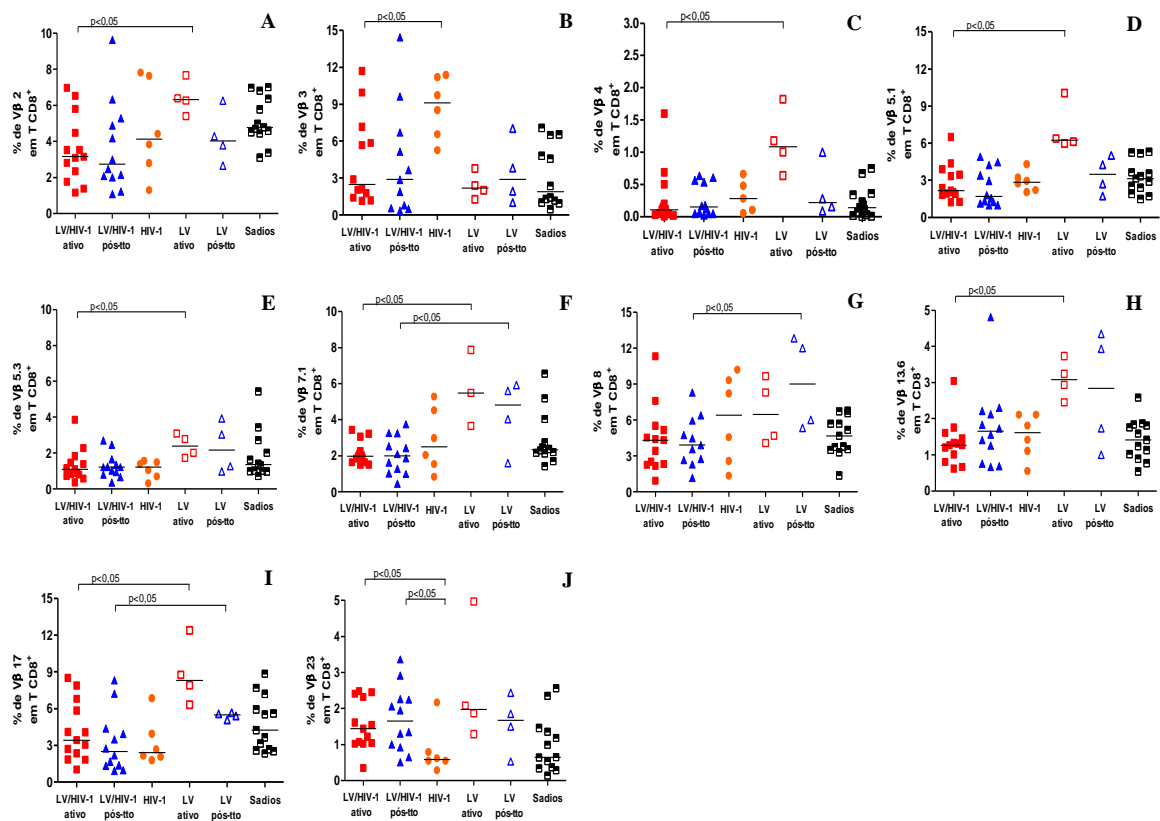


Figura 8. Comparação entre os percentuais medianos de utilização das famílias Vβ nas subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos pacientes LV/HIV-1 na fase ativa e no pós-tratamento anti-*Leishmania* com os respectivos grupos de pacientes HIV-1, sem leishmaniose, de LV sem HIV-1 e de indivíduos sadios. (A) Vβ2, (B) Vβ3, (C) Vβ4, (D) Vβ5.1, (E) Vβ5.3, (F) Vβ7.1, (G) Vβ8, (H) Vβ13.6, (I) Vβ17e (J) Vβ23. As barras representam a mediana dos valores.

Tabela 4. Famílias V $\beta$  utilizadas pelo repertório dos linfócitos T dos pacientes LV/HIV-1, em comum com os diferentes grupos e suas diferenças estatísticas.

V $\beta$ em T CD4 <sup>+</sup>	LV/HIV-1 ativo <sup>a</sup>	LV/HIV-1 pós-tto <sup>b</sup>	HIV-1 <sup>c</sup>	LV ativo <sup>d</sup>	LV pós-tto <sup>e</sup>	Sadio <sup>f</sup>	p<0,05
V $\beta$ 1							af, bf
V $\beta$ 2							----
V $\beta$ 4							af, bf
V $\beta$ 5.1							----
V $\beta$ 7.1							ad
V $\beta$ 7.2							ad
V $\beta$ 8							----
V $\beta$ 11							----
V $\beta$ 13.2							ac,af
V $\beta$ 17							ad
V $\beta$ 18							ac, af
V $\beta$ 23							
V $\beta$ em T CD8 <sup>+</sup>	LV/HIV-1 ativo <sup>a</sup>	LV/HIV-1 pós-tto <sup>b</sup>	HIV-1 <sup>c</sup>	LV ativo <sup>d</sup>	LV pós-tto <sup>e</sup>	Sadio <sup>f</sup>	p<0,05
V $\beta$ 2							ad
V $\beta$ 3							ac
V $\beta$ 4							ad
V $\beta$ 5.1							ad
V $\beta$ 5.3							ad
V $\beta$ 7.1							ad, be
V $\beta$ 7.2							----
V $\beta$ 8							be
V $\beta$ 11							----
V $\beta$ 17							ad, be
V $\beta$ 13.6							ad
V $\beta$ 23							ac, bc

<sup>a, b, c, d, e, f</sup> – grupos de indivíduos comparados entre si pelo teste ANOVA (Kruskal-Wallis) e pósteste de Dunns. Retângulos cinzas – membros V $\beta$  em comum entre os grupos avaliados.

### 5.8.5 Avaliação do perfil de distribuição das famílias V $\beta$ do TCR em pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1) avaliados prospectivamente

Após a descrição do perfil geral de distribuição das cadeias V $\beta$ , bem como a comparação entre as diferentes mobilizações apresentadas pelos pacientes de todos os grupos e indivíduos sadios, analisamos o perfil de TCRV $\beta$  de modo individual nos pacientes coinfectados. Para isso, escolhemos cinco pacientes de LV/HIV-1, os quais foram avaliados desde a fase ativa da doença até longo tempo após o tratamento específico

para *Leishmania*. Os momentos escolhidos foram: fase ativa da LV, logo após a finalização do tratamento para LV (pós-tto) e oito meses pós-tratamento (remissão clínica). Uma vez que, dentre esses cinco pacientes, dois deles reativaram a LV com menos de oito meses pós- tratamento, estes também foram analisados neste referido momento.

A abordagem utilizada por Pantaleo e colaboradores (1994) para analisar a dinâmica de utilização das diferentes cadeias V $\beta$  nos pacientes infectados pelo HIV-1 pode ser utilizada agora, uma vez que os pacientes coinfetados foram avaliados em pelo menos três momentos diferentes. Esta abordagem ainda não tinha sido utilizada para caracterizar o repertório dos pacientes apenas infectados pelo HIV-1 ou por *L.infantum*, porque tais análises se basearam em um único momento. Dessa maneira, os perfis de utilização puderam ser classificados como monoclonal (mobilização de um único membro, quando expresso por pelo menos mais de 10% dos linfócitos T), oligoclonal (dois ou mais V $\beta$ s mobilizados) ou policlonal (nenhuma alteração na expressão das cadeias V $\beta$ ) nos pacientes coinfetados. Os resultados foram considerados significativos quando os aumentos ou as reduções foram duas vezes os valores observados para cada cadeia V $\beta$ , antes do tratamento para *Leishmania*. Para os segmentos V $\beta$  expressos por menos de 2% das células T, apenas expansões ou reduções de quatro vezes foram consideradas significativas. As contagens de células T CD4<sup>+</sup> dos cinco pacientes são mostradas nos gráficos ao lado dos respectivos momentos avaliados (células/mm<sup>3</sup>).

O paciente Pt1 apresentou reduções significativas no percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando as cadeias V $\beta$ 1, V $\beta$ 4, V $\beta$ 7.2, V $\beta$ 13.2, V $\beta$ 16 e V $\beta$ 21.3 na fase de remissão clínica em relação à fase ativa da LV (Figura 9A). Nenhuma expansão foi observada nesse repertório. Ao analisarmos o período logo após o tratamento para *Leishmania*, verificamos que praticamente as mesmas famílias sofreram reduções significativas, executando-se apenas a cadeia V $\beta$ 16, e com a adição de outras duas, como V $\beta$ 7.1 e V $\beta$ 13.6. A comparação entre o período logo após o tratamento com a fase de remissão clínica revelou que de modo geral, o perfil de mobilização das cadeias V $\beta$  é o mesmo, com pequenas expansões ou reduções não significativas. A única exceção é a família V $\beta$ 2 que se expande significativamente na remissão clínica em relação à fase pós-tratamento (Figura 9A). As inúmeras variações encontradas no repertório de T CD4<sup>+</sup> pode ser coerente com o fato deste paciente não estar sob TARV na fase ativa da LV, iniciando-a com o tratamento para *Leishmania*. Ainda assim, o perfil monoclonal observado antes do tratamento é mantido após a terapia, apesar do longo tempo de remissão clínica e da

TARV. Em relação ao repertório T CD8<sup>+</sup> também observamos reduções significativas no pós-tratamento e na fase de remissão clínica em relação à fase ativa da LV, conforme mostra a Figura 10A. A única expansão significativa foi para o Vβ21.3 na remissão clínica. Entretanto, foi o Vβ3, embora não significativo, que definiu o perfil monoclonal na fase ativa e na remissão clínica (Figura 10A).

No que se refere ao paciente Pt2, que já se encontrava sob uso de TARV desde a fase ativa da LV, a única influência ao longo do tempo foi o tratamento para *Leishmania*. Neste, as mobilizações das cadeias Vβ nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> revelaram um perfil policlonal-símile na fase ativa da LV (Figura 9B). A família Vβ2 se destacou neste momento, mas não foi utilizada nem por 10% das células T CD4<sup>+</sup> deste paciente. Esse mesmo perfil policlonal foi mantido na fase de remissão clínica, com a família Vβ2 ainda sendo a mais utilizada neste momento do acompanhamento (6,8% das células T CD4<sup>+</sup>). Não foi observada a expansão significativa de nenhuma cadeia Vβ na remissão clínica e a única perturbação foi a redução significativa do Vβ5.3 e Vβ9. O repertório TCRVβ em T CD8<sup>+</sup> mostrou a maior mobilização da família Vβ3 na fase ativa da LV, definindo um perfil monoclonal-símile antes do tratamento neste paciente (Figura 10B). No entanto, embora essa mesma família tenha permanecido expandida na remissão clínica, de modo similar ao paciente Pt1, anteriormente descrito, o Vβ13.2 também passa a ser mais utilizado pelas células T CD8<sup>+</sup>, estabelecendo um perfil oligoclonal.

O paciente Pt3 também já se encontrava sob TARV no momento da admissão do protocolo de estudo. As principais mobilizações no repertório de linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem ser vistas pelas cadeias Vβ7.2, Vβ9, Vβ11, Vβ12 e Vβ18 que estavam expandidas na remissão clínica em relação à fase ativa da doença, enquanto que apenas a cadeia Vβ4 encontrava-se reduzida. Apesar dessas alterações, foi a família Vβ2 que se destacou na fase ativa da LV de Pt3 tendo sido utilizada por mais de 10% das células T CD4<sup>+</sup> e, portanto, definindo um perfil monoclonal-símile antes da terapia anti-*Leishmania*. Entretanto, o repertório TCRVβ em T CD4<sup>+</sup> sofreu uma transição para um perfil policlonal na remissão clínica (Figura 9C). Curiosamente, também verificamos uma transição de um perfil monoclonal-símile, inicialmente identificado pela mobilização aumentada do Vβ8 pelas células T CD8<sup>+</sup> na fase ativa da LV, para um perfil oligoclonal, com a utilização de mais uma família na remissão clínica de Pt3, o Vβ1 (Figura 10C).

É importante destacar que algumas famílias foram expressas pelos linfócitos T em percentuais muito irrelevantes, tais como Vβ4 e Vβ7.2 em T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> na remissão

clínica dos três pacientes avaliados e Vβ11 e Vβ18 em T CD8<sup>+</sup>, similar ao que foi visto no estudo transversal.

### Linfócitos T CD4<sup>+</sup>

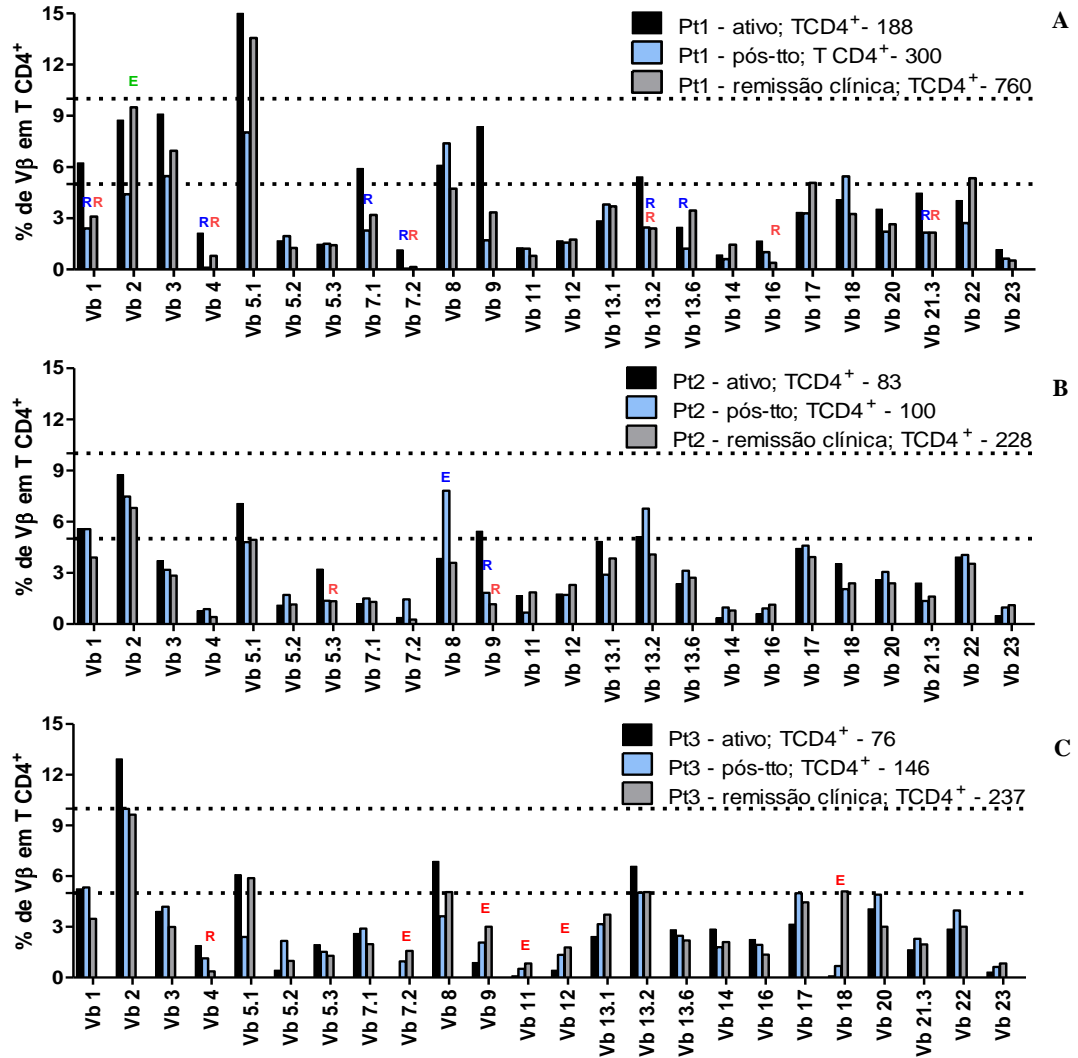


Figura 9. Distribuição do perfil individual de utilização das 24 famílias Vβ nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos pacientes LV/HIV-1acompanhados na fase ativa da LV, no pós-tratamento e na remissa clínica. Foram avaliados três pacientes coinfectados: Pt1 (A), Pt2 (B) e Pt3 (C). As barras representam o valor em percentuais de células T CD4<sup>+</sup> expressando um determinado Vβ. As linhas pontilhadas representam os percentuais de 5% e 10% de linfócitos T CD4<sup>+</sup> que expressam um determinado Vβ. <sup>E/R</sup>, expansões ou reduções significativas em relação à fase ativa da LV de um determinado Vβ em T CD4<sup>+</sup> durante a remissão clínica. <sup>E/R</sup> expansões ou reduções significativas em relação à fase ativa da LV, de um determinado Vβ em T CD4<sup>+</sup> no pós-tratamento. <sup>E</sup> expansão significativa da cadeia Vβ2 em T CD4<sup>+</sup> na remissão clínica em relação ao pós-tratamento.

## Linfócitos T CD8<sup>+</sup>

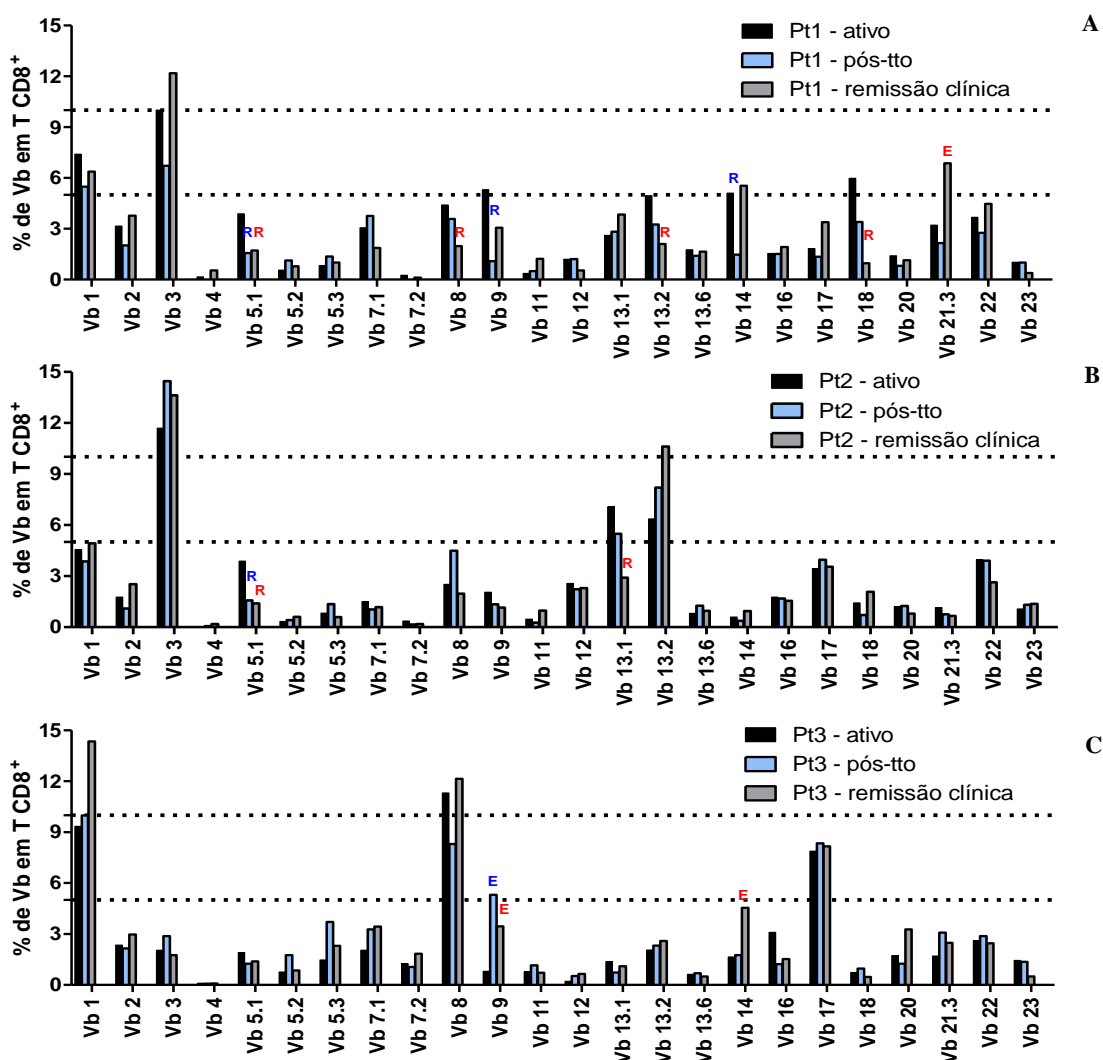


Figura 10. Distribuição do perfil individual de utilização das 24 famílias V $\beta$  nas subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos pacientes LV/HIV-1acompanhados na fase ativa da LV, no pós-tratamento e na remissa clínica. Foram avaliados três pacientes coinfectados: Pt1 (A), Pt2 (B) e Pt3 (C). As barras representam o valor em percentuais de células T CD8<sup>+</sup> expressando um determinado V $\beta$ . As linhas pontilhadas representam os percentuais de 5% e 10% de linfócitos T CD8<sup>+</sup> que expressam um determinado V $\beta$ . <sup>E/R</sup>, expansões ou reduções significativas em relação à fase ativa da LV, de um determinado V $\beta$  em T CD8<sup>+</sup> durante a remissão clínica. <sup>E/R</sup> expansões ou reduções significativas em relação à fase ativa da LV, de um determinado V $\beta$  em T CD8<sup>+</sup> no pós-tratamento.

Posteriormente, a utilização das 24 famílias V $\beta$  no repertório de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foi analisada em dois pacientes acompanhados desde a fase ativa da LV, mas que apresentaram um episódio de reativação da LV longo tempo após o tratamento específico.

O paciente Pt4, da mesma maneira que o paciente Pt1, descrito anteriormente, não se encontrava sob TARV na fase ativa da LV, porém nos momentos seguintes avaliados o mesmo já havia iniciado a terapia. Este paciente apresentou um perfil monoclonal-símile com a utilização da família V $\beta$ 8 por mais de 10% das células T CD4<sup>+</sup> antes e logo após o tratamento. No entanto, uma redução significativa no uso desta cadeia foi observada no momento da recidiva. Outras importantes reduções também foram verificadas no momento da recidiva, como V $\beta$ 9 e V $\beta$ 18. Simultaneamente, em coerência com um repertório perturbado, outras cadeias passaram a ser mais utilizadas no momento da recidiva, conforme mostrado na figura 11A e o perfil passou a ser policlonal-símile sem destaque para nenhum membro V $\beta$ . Interessantemente, o percentual de utilização das cadeias V $\beta$  pelas células T CD8<sup>+</sup> ultrapassou 5% de utilização apenas nas famílias V $\beta$ 8, V $\beta$ 20 e V $\beta$ 21.3 no pós-tratamento e V $\beta$ 22 na recidiva ao lado de V $\beta$ 2 nos três momentos, mantendo um perfil policlonal-símile desde a fase ativa (Figura 11B).

O paciente Pt5, diferentemente do paciente Pt4 acima descrito, já estava sob TARV desde o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 em 2010. A distribuição das famílias V $\beta$  em T CD4<sup>+</sup> neste paciente revelou um perfil oligoclonal-símile durante a fase ativa da LV. Não foram observadas muitas diferenças neste perfil na fase logo após o tratamento, tendo apenas três famílias expandindo-se significativamente neste período em relação à fase ativa da LV. Entretanto, inúmeras reduções significativas foram verificadas no repertório TCRV $\beta$  entre o período pós-tratamento e a recidiva da LV (Figura 11C), levando conseqüentemente a um perfil policlonal durante o retorno dos sinais e sintomas clínicos de uma LV ativa. Em T CD8<sup>+</sup>, a fase ativa e pós-tratamento não diferiram quanto à utilização das cadeias V $\beta$ . No entanto, durante a recidiva as mobilizações foram significativamente diferentes em relação às outras duas fases, com destaque para as mesmas famílias: V $\beta$ 3 (expansão), V $\beta$ 5.1 (redução), V $\beta$ 9 (redução), V $\beta$ 11 (expansão) e V $\beta$ 18 (redução). Da mesma maneira que no TCRV $\beta$  em T CD4<sup>+</sup>, o perfil oligoclonal inicialmente observado, se alterou para um perfil policlonal-símile (Figura 11D).

Interessantemente, o percentual geral de utilização das cadeias V $\beta$  pelas células T CD8<sup>+</sup> dos dois pacientes (Pt3 e Pt4) foi mais baixo do aquele observado para o repertório em T CD4<sup>+</sup> e muito alterado em relação ao TCRV $\beta$  de T CD8<sup>+</sup> dos outros pacientes descritos anteriormente (Pt1, Pt2 e Pt3). Ao mesmo tempo em que V $\beta$ 4 e V $\beta$ 7.2 foram inexpressivas, também verificamos que o V $\beta$ 3, importante na infecção pelo HIV-1 e com importante participação na co-infecção, foi subutilizado por Pt4 e Pt5.

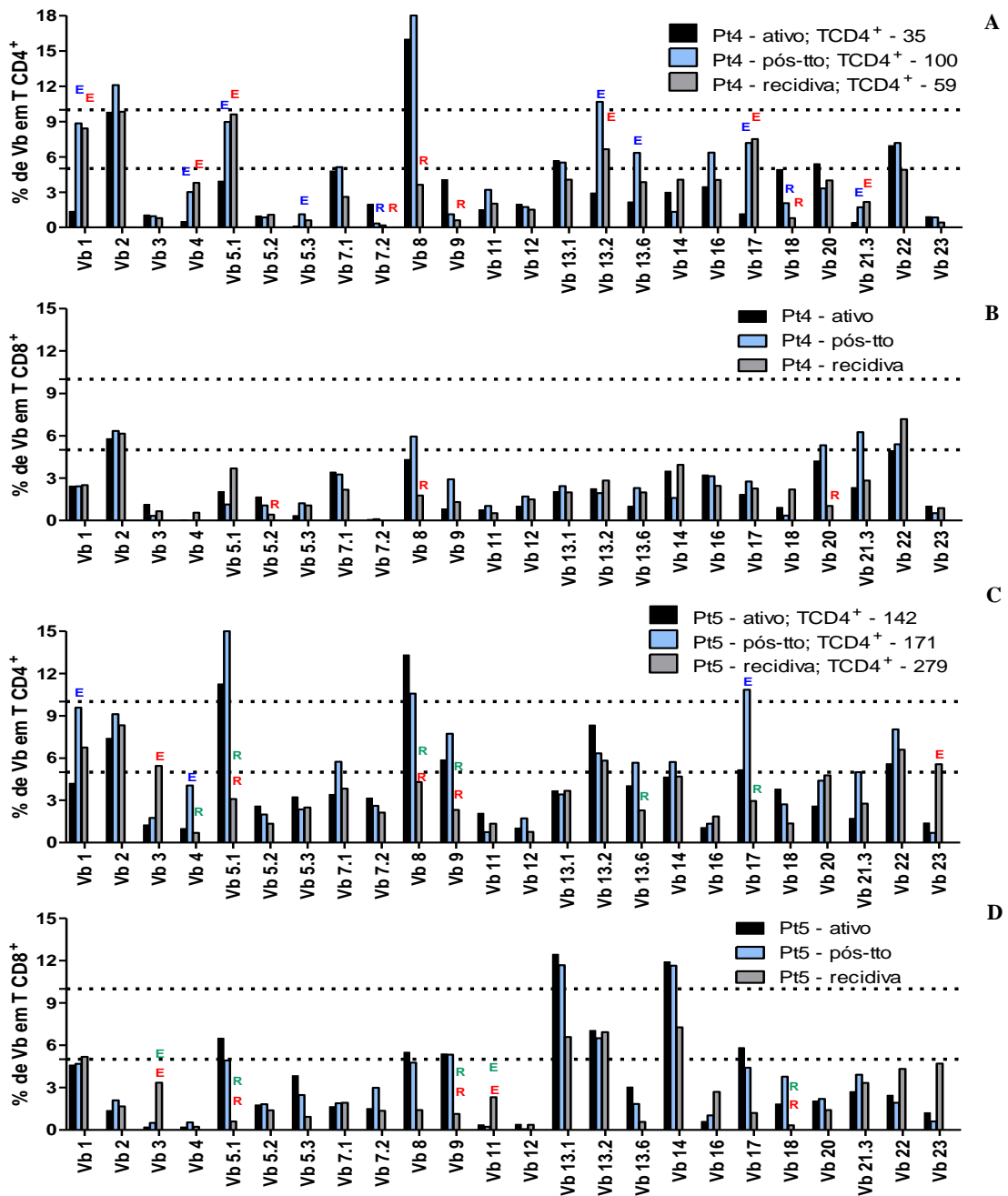


Figura 11. Distribuição do perfil individual de utilização das 24 famílias V $\beta$  nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> nos pacientes LV/HIV-1acompanhados na fase ativa da LV, no pós-tratamento e na recidiva. Foram avaliados dois pacientes coinfetados: Pt4 (A e B), Pt5 (C e D). As barras representam o valor em percentuais das subpopulações de linfócitos T expressando um determinado V $\beta$ . As linhas pontilhadas representam os percentuais de 5% e 10% de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> que expressam um determinado V $\beta$ . E/R, E/R expansões ou reduções significativas em relação à fase ativa da LV, de um determinado V $\beta$  nos linfócitos T durante a recidiva e durante o pós-tratamento, respectivamente. E/R expansões ou reduções significativas de um determinado V $\beta$  na fase de recidiva, em relação ao pós-tto da LV.



### **5.8.6 Avaliação do perfil de distribuição das famílias V $\beta$ do TCR após a estimulação *in vitro* com antígenos específicos em pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1 (LV/HIV-1).**

Com o intuito de investigar o perfil de distribuição das famílias do repertório TCRV $\beta$  frente a antígenos específicos, as células mononucleares do sangue periférico dos pacientes de LV/HIV-1 foram estimuladas *in vitro* por 72 horas com *Leishmania infantum* (Li) e com a proteína p24 do HIV-1. O repertório foi avaliado em três pacientes de LV/HIV-1 que foram acompanhados desde a fase ativa até a fase logo após o tratamento (pós-tto). Dois pacientes escolhidos foram os mesmos já avaliados anteriormente, como Pt1 e Pt3 *ex vivo*. Os resultados foram considerados significativos quando os aumentos ou as reduções frente aos antígenos foram duas vezes os valores observados para cada cadeia V $\beta$ , sem estímulo específico (BG). Para as famílias expressas por menos de 2% das células T, apenas diferenças de quatro vezes em relação ao BG foram consideradas significativas. As Tabelas 5, 6 e 7 mostram os resultados de Pt1, Pt3 e Pt12, respectivamente. Como a maioria das famílias V $\beta$  avaliadas frente aos estímulos específicos não apresentou diferenças em relação ao controle (BG), apenas aquelas cujas diferenças foram significativas estão mostradas nas tabelas. Além disso, cinco indivíduos saudáveis também tiveram suas células estimuladas com os mesmos antígenos específicos a fim de verificar se o aumento ou a diminuição de uma determinada família frente a um dos estímulos em cada um dos três pacientes LV/HIV-1 também ocorria no grupo de saudáveis (resultados não mostrados).

Na fase ativa da LV o paciente Pt1 apresentou expansões significativas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando V $\beta$  5.1 e V $\beta$ 18 para os antígenos de Li e p24, enquanto que àqueles com as cadeias V $\beta$ 7.2 e V $\beta$ 8 se expandiram significativamente apenas frente ao antígeno de Li e àqueles com a cadeia V $\beta$ 3 para p24 (Tabela 5). As reduções foram significativas para as células T CD4<sup>+</sup> expressando V $\beta$ 9 para Li e V $\beta$ 20 para p24. Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas em relação ao BG, o V $\beta$ 20 ao lado do V $\beta$ 8 definiram um perfil oligoclonal-símile para Li na fase ativa da LV em Pt1. Apesar da família V $\beta$ 2 ter sido utilizada por cerca de 9% dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> frente ao p24, o perfil observado foi policlonal-símile.

Na fase logo após o tratamento, observou-se que o perfil oligoclonal de distribuição do TCRV $\beta$  nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> frente aos antígenos de Li foi mantido,

porém com a mobilização de cadeias diferentes. As cadeias V $\beta$ 8 e V $\beta$ 20 que foram expressas por mais de 10% das células T CD4<sup>+</sup> na fase ativa da LV, mostraram reduções significativas no pós-tratamento (expressas por 6,5% e 3,5% das células T CD4<sup>+</sup>, respectivamente). Ao mesmo tempo as cadeias V $\beta$ 2 e V $\beta$ 5.1 que já se destacavam na fase ativa da LV se configuram como as mais utilizadas pelas células T CD4<sup>+</sup> frente ao antígeno de Li (Tabela 5). O perfil de distribuição do TCRV $\beta$  para o antígeno p24 no pós-tratamento de Pt1 não apresentou nenhuma mobilização de destaque, diferente do observado na fase ativa e manteve um perfil policlonal-símile.

Já para as células T CD8<sup>+</sup> do paciente Pt1, apenas uma expansão significativa foi detectada (V $\beta$ 3), definindo o perfil monoclonal para o antígeno p24 na fase ativa da LV (Tabela 5). Esta família também mostrou um aumento de utilização para o antígeno de *Leishmania*, mas sem diferença significativa em relação ao poço sem estímulo, configurando um perfil sem alterações importantes (policlonal-símile) na população T CD8<sup>+</sup>. As demais famílias não apresentaram mobilizações importantes para nenhum dos dois antígenos e cinco famílias foram menos utilizadas frente à Li (reduções), em comparação com o BG (Tabela 5). No pós-tratamento foram observadas apenas duas expansões significativas em T CD8<sup>+</sup>, como V $\beta$ 7.2 frente à Li e V $\beta$ 8 frente ao p24, definindo um perfil policlonal para ambos os antígenos.

De forma interessante, o paciente Pt3 também apresentou expansões significativas da cadeia V $\beta$ 18 para o antígeno de Li ao lado da cadeia V $\beta$ 13.2 na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Tabela 6). Novamente, o V $\beta$ 2 foi bastante utilizado pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> frente à Li e ao p24, mas sem diferença significativa em relação ao poço sem estímulo. Neste paciente, V $\beta$ 2 definiu um perfil monoclonal-símile de resposta ao p24 (expresso por 10,34% dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>), enquanto que nenhuma família foi utilizada por mais de 10% das células T CD4<sup>+</sup> frente à *Leishmania*. O perfil TCRV $\beta$  em T CD8<sup>+</sup> estabeleceu um perfil oligoclinal para o antígeno Li, devido à expansão significativa de V $\beta$ 8 em relação ao BG, ao lado de V $\beta$ 1 na fase ativa da LV. As alterações na mobilização das cadeias V $\beta$  na fase pós-tratamento são mostradas em ambas as subpopulações de linfócitos T para os dois antígenos na Tabela 6. Entretanto, nenhuma cadeia foi capaz de dominar a distribuição do repertório que se caracterizou como policlonal.

Finalmente, o último paciente avaliado antes e após o tratamento foi Pt12 que reiniciou a TARV com o fim do tratamento específico para LV. Neste paciente, as mobilizações do TCRV $\beta$  em T CD4<sup>+</sup> estabeleceu um perfil oligoclinal, com expansões

significativas das cadeias V $\beta$ 5.1 (11,7%), V $\beta$ 8, V $\beta$ 9 (10,13%) e V $\beta$ 13.2, frente à Li (Tabela 7) na fase ativa da LV. Entretanto, tais expansões não se mantiveram após o tratamento e o perfil sofreu uma transição para policlonal, com exceção de V $\beta$ 5.1 que ainda permaneceu mais elevado. Em relação ao antígeno p24, a família V $\beta$ 2, similarmente a Pt3, também se destacou como uma das mais utilizadas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> apenas na fase ativa da LV, mas sem diferenças em relação ao BG. A família V $\beta$ 3 também é mobilizada frente ao p24, mas sem definir um perfil que se apresentou policlonal antes e após o tratamento. Conforme verificado para Pt1, a cadeia V $\beta$ 3 em T CD8<sup>+</sup> também parece se expandir frente ao antígeno de p24 na fase ativa da LV, mas o perfil policlonal permanece após o tratamento.

É importante destacar que apesar da família V $\beta$ 2 ter se destacado com altos percentuais de utilização em T CD4<sup>+</sup> em Pt1 e Pt12, não foram observadas expansões significativas em relação ao poço não estimulado. Os mesmos resultados foram encontrados no grupo de sadios avaliados, cujo percentual foi elevado para os dois antígenos, mas sem diferença em relação ao BG. Além disso, o uso dos segmentos V $\beta$  nos indivíduos sadios mostrou que a maioria das famílias foram igualmente expressas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> na presença ou na ausência da estimulação antigênica, com exceção para V $\beta$ 5.1 e V $\beta$ 8 em T CD4<sup>+</sup> que se expandem frente a Li e de V $\beta$ 11 que reduz frente a p24 em T CD8<sup>+</sup>.

Tabela 5. Percentuais de utilização de algumas famílias V $\beta$  nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> frente aos antígenos de *Leishmania infantum* e p24 do HIV-1 no paciente LV/HIV-1 (Pt1) acompanhado na fase ativa da LV e no pós-tratamento anti-*Leishmania*.

TCR V $\beta$	Pt1											
	Fase ativa						Fase pós-tratamento					
	CD4			CD8			CD4			CD8		
	BG	Li	p24	BG	Li	p24	BG	Li	p24	BG	Li	p24
V $\beta$ 2	8,9	9,1	8,8	2,9	2,4	3,0	6,5	10,1	9,3	3,8	4,1	3,4
V $\beta$ 3	4,2	2,7	8,5	5,2	8,1	11,5	6,2	5,3	5,6	7,3	8,3	8,1
V $\beta$ 5.1	2,5	6,8	7,1	1,0	0,3	2,0	8,0	17,7	7,9	2,8	2,6	1,6
V $\beta$ 7.2	0,3	1,0	0,3	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,8	0,1	0,2	0,1
V $\beta$ 8	5,3	13,1	5,0	5,3	2,5	3,8	4,5	6,5	5,8	1,9	3,3	4,0
V $\beta$ 9	2,5	0,5	1,3	1,7	0,6	0,2	1,9	2,9	1,7	2,2	2,6	1,6
V $\beta$ 11	1,9	0,9	1,8	1,0	0,2	1,5	0,8	1,2	0,7	0,9	0,9	0,9
V $\beta$ 13.2	3,1	1,7	1,6	1,6	0,6	2,2	3,5	2,8	2,7	2,7	2,2	1,5
V $\beta$ 14	1,1	2,5	0,5	4,9	2,2	3,9	1,7	2,8	2,5	3,2	3,1	3,1
V $\beta$ 17	3,5	5,0	5,4	0,9	0,2	1,3	5,1	4,9	5,7	1,9	1,9	2,2
V $\beta$ 18	0,3	1,2	4,2	1,8	0,7	1,4	1,4	5,7	2,6	2,3	2,8	0,9
V $\beta$ 20	6,2	10,5	2,2	1,6	1,3	0,9	4,1	3,5	3,0	1,2	1,2	1,4
V $\beta$ 22	4,6	2,9	2,9	3,9	1,3	5,1	4,7	5,1	4,6	4,1	5,2	4,7

**Vermelho** – diferença significativa do percentual de utilização de uma determinada família V $\beta$  frente ao antígeno de *L. infantum* em relação ao poço não estimulado (BG).

**Azul** – diferença significativa do percentual de utilização de uma determinada família V $\beta$  frente ao antígeno de p24 do HIV-1 em relação ao poço não estimulado (BG).

**Tabela 6.** Percentuais de utilização de algumas famílias V $\beta$  nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> frente aos antígenos de *Leishmania infantum* (Li) e p24 do HIV-1 no paciente LV/HIV-1 (Pt3) acompanhado na fase ativa da LV e no pós-tratamento anti-*Leishmania*.

TCR V $\beta$	Pt3											
	Fase ativa						Fase pós-tratamento					
	CD4			CD8			CD4			CD8		
	BG	Li	p24	BG	Li	p24	BG	Li	p24	BG	Li	p24
V $\beta$ 1	4,6	3,5	5,1	6,6	10,8	7,6	2,8	5,1	6,8	8,9	7,7	9,7
V $\beta$ 2	6,5	8,9	10,3	2,0	2,4	2,0	6,3	9,3	9,5	1,8	0,9	4,4
V $\beta$ 5.1	3,9	4,3	4,7	1,5	1,9	1,2	2,8	5,1	4,8	3,6	7,5	5,4
V $\beta$ 8	3,6	5,0	4,7	5,0	10,2	9,8	5,4	5,8	4,9	6,2	8,9	8,5
V $\beta$ 11	0,4	0,8	1,8	0,6	0,7	0,5	1,3	0,8	1,3	1,3	2,2	0,1
V $\beta$ 13.2	3,8	7,9	6,8	1,3	1,3	2,8	4,0	3,9	6,3	2,9	6,2	2,9
V $\beta$ 18	1,1	4,5	4,3	1,3	2,6	2,0	2,7	2,8	3,2	1,9	5,0	3,8

**Vermelho** – diferença significativa do percentual de utilização de uma determinada família V $\beta$  frente ao antígeno de *L.infantum* em relação ao poço não estimulado (BG). **Azul** – diferença significativa do percentual de utilização de uma determinada família V $\beta$  frente ao antígeno de p24 do HIV-1 em relação ao poço não estimulado (BG).

**Tabela 7.** Percentuais de utilização de algumas famílias V $\beta$  nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> frente aos antígenos de *Leishmania infantum* (Li) e p24 do HIV-1 no paciente LV/HIV-1 (Pt12) acompanhado na fase ativa da LV e no pós-tratamento anti-*Leishmania*.

TCR V $\beta$	Pt12											
	Fase ativa						Fase pós-tratamento					
	CD4			CD8			CD4			CD8		
	BG	Li	p24	BG	Li	p24	BG	Li	p24	BG	Li	p24
V $\beta$ 3	1,1	3,3	4,0	0,5	1,9	2,5	1,7	2,5	2,7	2,2	1,6	1,8
V $\beta$ 5.1	5,7	11,7	9,1	4,9	9,1	8,2	2,1	5,5	3,9	0,9	1,9	1,7
V $\beta$ 8	4,5	9,1	7,2	2,3	2,9	3,9	5,6	6,5	3,7	3,8	2,6	2,9
V $\beta$ 9	4,8	10,1	9,3	3,4	2,5	8,2	1,7	3,2	1,9	0,7	1,6	1,3
V $\beta$ 11	1,1	0,7	1,7	1,2	0,3	0,5	1,3	1,5	2,3	0,2	0,4	0,9
V $\beta$ 13.2	2,9	6,7	5,4	6,7	11,8	7,9	3,7	4,6	6,1	3,5	5,3	4,4
V $\beta$ 17	5,6	8,7	4,6	3,3	1,1	1,7	1,6	4,5	3,9	1,1	3,4	4,7

**Vermelho** – diferença significativa do percentual de utilização de uma determinada família V $\beta$  frente ao antígeno de *L.infantum* em relação ao poço não estimulado (BG). **Azul** - diferença significativa do percentual de utilização de uma determinada família V $\beta$  frente ao antígeno de p24 do HIV-1 em relação ao poço não estimulado (BG).

## 6. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral (LV) é considerada uma doença tropical negligenciada causada pela *Leishmania infantum* no Brasil. A LV possui uma alta taxa de mortalidade e mesmo em pacientes tratados a taxa de casos fatais alcança cerca de 10-20% (Alvar et al. 2012). Nos últimos anos, a expansão da epidemia do HIV-1 para as áreas endêmicas de LV e vice-versa tem aumentado o número de pacientes coinfectados, principalmente se levarmos em consideração o número de subnotificações (Alvar et al. 2008). Além disso, a LV é considerada uma infecção oportunista em pacientes infectados pelo HIV-1, embora ainda não seja considerada uma doença definidora de AIDS.

A resposta imunológica está diretamente envolvida no desfecho clínico de ambas as doenças. Considerando que ambas compartilham mecanismos imunológicos que comprometem a resposta imune, prejuízos recíprocos podem ser observados nos pacientes coinfectados, especialmente no controle do patógeno (Zhao et al. 2004, Barreto-de-Souza et al. 2006). Neste contexto, este estudo teve por objetivo estudar mecanismos imunopatogênicos decorrentes do efeito da interação entre esses patógenos e de que maneira a infecção por *Leishmania* poderia impactar o grau de comprometimento quantitativo e qualitativo do sistema imune dos pacientes coinfectados. Além disso, foi avaliado o impacto da terapia antiretroviral (TARV) e do tratamento anti-*Leishmania* na reconstituição imune desses pacientes e sua influência na prevenção ou não das reativações da LV em pacientes concomitantemente infectados pelo HIV-1.

Para isso, foram avaliados pacientes com coinfectados LV/HIV-1 na fase ativa e na fase de remissão clínica (documento 1, 2, 4 e apêndice de resultados). Além disso, sete pacientes foram acompanhados longitudinalmente até longo tempo após a remissão clínica (apêndice de resultados). Apenas oito pacientes coinfectados com a forma tegumentar da doença (LTA/HIV-1) foram estudados durante a remissão clínica da doença (documento 1). A título de comparação, também foram estudados indivíduos infectados pelo HIV-1, sem leishmaniose, indivíduos portadores de leishmaniose visceral (fase ativa e de remissão), sem infecção pelo HIV-1 e indivíduos saudáveis.

Os pacientes LV/HIV-1 apresentam uma doença mais grave em comparação àqueles com LV apenas, com maiores níveis de carga parasitária (documento 4), maior resistência a drogas e com maior suscetibilidade a reativações frequentes (Alexandrino-de-Oliveira et al. 2010, Cota et al. 2011). Por outro lado, a infecção por *Leishmania* também

pode contribuir para uma progressão mais rápida para a AIDS em indivíduos infectados pelo HIV-1, agravando a depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Alexandrino-de-Oliveira et al. 2010) e a estimulação crônica do sistema imune (documento 1), distúrbios estes, já observados em pacientes mono infectados pelo HIV-1.

De fato, nossos dados mostraram que os pacientes LV/HIV-1 tratados apresentaram os menores níveis de células T CD4<sup>+</sup> circulantes e os maiores níveis de ativação celular apesar do uso de TARV e do tratamento específico para *Leishmania*. Estes resultados diferiram significativamente dos casos de coinfeção LTA/HIV-1 e dos casos de HIV-1 apenas. Embora as contagens de T CD4<sup>+</sup> não tenham sido diferentes entre os casos de LTA/HIV-1 e os de monoinfeção pelo HIV-1, a coinfeção ainda apresentava percentuais de células T CD8<sup>+</sup> ativadas superiores (documento 1).

A infecção e morte direta dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> é um dos mecanismos envolvidos na depleção dessas células na infecção pelo HIV-1 (Douek et al. 2002). A introdução da TARV geralmente resulta na supressão da replicação viral para níveis plasmáticos abaixo do limite de detecção, aumento das contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e redução da morbidade e mortalidade dos indivíduos infectados pelo HIV-1 (Lawn et al. 2001). Entretanto, as baixas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> observadas na remissão clínica dos pacientes LV/HIV-1 foram independentes dos níveis de carga viral plasmática (documento 1) e do uso de TARV. Esses mesmos dados se repetiram em pacientes coinfectados durante a fase ativa da doença e com uma casuística nova apresentada no apêndice de resultados, na qual pudemos observar os mesmos pacientes antes e após o tratamento para a LV (n=7). Assim, podemos dizer que os pacientes coinfectados avaliados neste presente estudo apresentaram uma discordância imunológica, independente da fase clínica da LV e do uso de TARV. Esses dados estão de acordo com dados da literatura cuja recuperação subótima da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> também ocorreu em indivíduos infectados pelo HIV-1 avirêmicos (Lederman et al. 2003, Goicoechea et al. 2006) e sugerem a participação de outros mecanismos.

Vários estudos anteriores demonstraram que a manutenção da depleção de células T CD4<sup>+</sup> em indivíduos sob longo tempo de TARV pode envolver vários mecanismos não mutuamente exclusivos e, que, portanto, agem conjuntamente (Corbeau & Reynes. 2011). A replicação viral residual nos tecidos linfoides é um destes e não pode ser descartada. No entanto, a persistente ativação do sistema imune, e suas consequências, como imunosenescência acelerada, morte celular induzida por ativação e a alteração na

capacidade de renovação de células T vem sendo considerada como uma das principais causas que agravam tal fenômeno (Teixeira et al. 2001, Anthony et al. 2003, Hunt et al. 2003, Piconi et al. 2010). De fato, os pacientes LV/HIV-1 apresentaram elevados níveis de ativação linfocitária e estes não só foram independentes da carga viral baixa ou indetectável, como também mais elevados quando comparados aos casos só de HIV-1, sugerindo a participação da infecção por *Leishmania*. Dessa maneira, a análise de regressão linear, na qual as variáveis confundidoras foram controladas, realmente nos confirmou que a infecção por este parasito constitui-se como um cofator importante para o aumento dos níveis de ativação celular em pacientes infectados pelo HIV-1, independente das contagens de T CD4<sup>+</sup> e da carga viral plasmática. Essa associação pode indicar que o importante valor preditivo já descrito para a molécula CD38 na infecção pelo HIV-1, pode não ser útil para o monitoramento da coinfeção, uma vez que seus níveis podem permanecer elevados independentemente do momento clínico da LV. Estudos anteriores de nosso grupo também atribuíram o aumento dos níveis de ativação em pacientes infectados pelo HIV-1, à presença de coinfeções com o *Plasmodium falciparum* na malária (Chavale et al. 2012) e com o *Micobacterium leprae* previamente aos episódios de IRIS/RR na hanseníase (Giacioia-Gripp et al. 2011).

Em adição, a própria LV pode contribuir para agravar o comprometimento imune desses pacientes coinfectados, uma vez que esta doença cursa com uma imunossupressão do sistema imune, com diminuição de linfócitos T e de outras linhagens de células hematopoiéticas (documento 3, Saha et al. 2006). Assim, ambos os patógenos, *L. infantum* e HIV-1 comprometem os órgãos linfoides primários, como medula óssea e timo. O tropismo do parasito pela medula óssea pode prejudicar a liberação de progenitores de linfócitos T que completarão sua maturação no timo, influenciando na capacidade de regeneração de novas células T CD4<sup>+</sup> para a periferia. Ao mesmo tempo, as células do estroma tímico e os timócitos podem ser diretamente infectados pelo HIV-1 ou mesmo sofrerem das consequências da ativação imune, com exaustão clonal e mudanças na arquitetura deste tecido linfoide (McCune. 2001). Além das alterações nos órgãos centrais, os maiores níveis de ativação imune nesses pacientes coinfectados também podem comprometer a arquitetura dos tecidos linfoides periféricos com interrupção dos mecanismos homeostáticos de manutenção das células T *naive* pós-migração do timo. O processo fibrótico decorrente está diretamente relacionado à limitação da reconstituição



imunológica (Schacker et al. 2002, 2006), mesmo na ausência de viremia (Nies-Kraske et al. 2009).

Entretanto, o que mais nos chamou atenção nesse primeiro trabalho (documento 1), além do intenso comprometimento imunológico observado nos pacientes com a forma visceral da doença, foi que os níveis de ativação foram mantidos mesmo na remissão clínica e na ausência de carga viral detectável, sugerindo que a persistência do parasito na LV também poderia contribuir para a contínua estimulação dos linfócitos. Esse ambiente de comprometimento da resposta imune efetora aliado às baixas contagens de T CD4<sup>+</sup> e altos níveis de ativação pode favorecer o retorno da replicação parasitária e, portanto, das frequentes recidivas verificadas, especialmente naqueles com a forma visceral da doença.

O relato de caso apresentado no documento 2 foi de extrema importância para ratificar algumas questões importantes verificadas no documento 1. O acompanhamento prospectivo desse paciente com longo tempo de evolução clínica da LV sem tratamento, porém sob TARV desde a descoberta do HIV-1 em 1998 mostrou que: (1) as contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> não aumentam apesar da TARV e do início do tratamento anti-*Leishmania* administrado, (2) a carga viral permaneceu indetectável durante todo o acompanhamento clínico, (3) os níveis de ativação são muito elevados e superiores aos observados em pacientes com a forma tegumentar da doença e aos casos de HIV-1, (4) os níveis de ativação permaneceram elevados, especialmente para a molécula CD38, mesmo na remissão clínica e aumentaram durante a reativação, (5) a TARV não impediu a reativação. Além disso, os persistentes níveis de ativação ao longo do acompanhamento podem ter contribuído para o prejuízo da função efetora, conforme observado pela ausência de reatividade linfocitária aos antígenos do parasito e do HIV-1 (p24), bem como pela diminuição dos níveis de IFN- $\gamma$  nas culturas de células estimuladas a cada momento clínico estudado. Tais fatores aliado à persistência parasitária (dados não mostrados) podem ter contribuído para a reativação da LV.

A patogênese da LV também pode ter contribuído para a intensa linfopenia observada neste paciente, principalmente se levarmos em consideração que a TARV foi rapidamente iniciada neste paciente, mas o tratamento da LV só ocorreu oito anos após a descoberta do HIV. Esses dados parecem sugerir que uma vez que ocorre o comprometimento imune na fase ativa da LV conjuntamente com a infecção pelo HIV-1, os baixos níveis de T CD4<sup>+</sup> podem perdurar e não serem revertidos mesmo sob TARV e tratamento específico para o parasito. Vários estudos descritos na literatura também já

demonstraram que as contagens de células T CD4<sup>+</sup> no momento da descoberta do HIV-1 e início da TARV influenciam não só a possibilidade de uma reconstituição imunológica efetiva, mas também afeta o tempo necessário para alcançar esse objetivo (D'Amico et al. 2005, Kelley et al. 2009). Independentemente se a LV foi contraída antes ou depois da infecção pelo HIV-1, o episódio ativo da doença pode agravar o comprometimento imune, explicando inclusive as inúmeras disseminações cutâneas. Entretanto, a avaliação no momento da infecção pelo HIV-1 é muito difícil, pois a maioria desses pacientes coinfectados já apresenta esta infecção no momento da admissão do protocolo de estudo. Neste trabalho, tivemos a oportunidade de acompanhar um paciente (Pt1) que iniciou a TARV com 188 células/mm<sup>3</sup>, mas alcançou níveis de 760 células/mm<sup>3</sup> após 10 meses de tratamento com TARV e finalização do tratamento com anfotericina B, constituindo-se em uma exceção ao que foi exposto acima.

Recentes evidências indicaram que além das coinfeções e da própria replicação viral, a translocação de produtos microbianos, entre eles o LPS, do lúmen intestinal para a circulação periférica também pode contribuir para a ativação imune durante a infecção crônica pelo HIV-1 (Brenchley et al. 2006b). Consistente com a função imunoestimulatória desta molécula, os níveis de LPS foram associados a vários marcadores de ativação da imunidade inata e/ou adaptativa, seja no microambiente do GALT - (Estes et al. 2010) ou na circulação sistêmica (Brenchley et al. 2006b, Jiang et al. 2009). No entanto, é importante destacar que os humanos apresentam vários mecanismos de proteção contra a translocação desses produtos microbianos de origem intestinal (Brenchley & Douek. 2012). A camada de muco presente no lúmen do trato gastrointestinal, células intestinais, defensinas antimicrobianas, IgA de mucosa, macrófagos residentes, junções do tipo *tight* e a própria barreira epitelial evitam a passagem desses produtos. Em adição, anticorpos com atividade neutralizante contra o LPS (EndoCab), assim como, CD14 solúvel (sCD14), LBP (proteína ligadora de LPS) e HDL (lipoproteína de alta densidade) podem agir para eliminar tais produtos bacterianos, uma vez que eles tenham atravessado a barreira intestinal e entrado na circulação (Brenchley & Douek. 2012).

Nesse contexto, qualquer alteração na permeabilidade seletiva da barreira intestinal ou perda da regulação imune no microambiente da mucosa ou mesmo de um dos mecanismos de proteção acima citados, pode facilitar a translocação microbiana. Levando em consideração que as células da mucosa intestinal podem se apresentar parasitadas na

LV (Baba et al. 2006, Luz et al. 2010), não seria inesperado que o dano intestinal com consequente passagem de produtos microbianos pudesse ocorrer nesses pacientes. Além disso, a LV apresenta algumas características patogênicas similares à infecção pelo HIV-1, no que se refere à diminuição das contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> periféricos, intensa resposta inflamatória e ativação imune. Assim, primeiramente investigamos se os níveis de LPS poderiam estar aumentados no plasma de pacientes com LV apenas e se estes poderiam se correlacionar com os níveis de ativação celular descritos nesta doença. Posteriormente, avaliaríamos a translocação nos pacientes concomitantemente infectados por *L. infantum* e HIV-1.

Nossos resultados mostraram a presença de níveis aumentados de LPS plasmático nos pacientes de LV apenas em relação aos sadios. Além disso, este incremento dos níveis de LPS se correlacionaram com as reduzidas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, bem como com a ativação sistêmica e com os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8 e MIF), sugerindo que uma molécula bacteriana não associada à infecção por *Leishmania* pode exercer efeitos deletérios sobre o sistema imune.

Os níveis de LPS também se correlacionaram com o sCD14 e com a proteína intestinal ligadora de ácido graxo (IFABP) nos pacientes de LV, sugerindo que o LPS é bioativo e de provável origem luminal. O *status* de ativação elevado nesses pacientes foi observado através do percentual de linfócitos T expressando as moléculas HLA-DR, CD38 e CD25 e pelos níveis elevados de citocinas pró e anti-inflamatórias. Tais resultados são absolutamente consistentes com os relatos anteriores de que a LV se apresenta clinicamente como uma síndrome inflamatória sistêmica (Costa et al. 2010), similar à sepse, à malária e à febre do dengue. Mais recentemente denominado como “cytokine storm”, tal perfil misto de citocinas não se normalizou mesmo após o tratamento específico para *Leishmania* (Peruhype-Magalhães et al. 2006, Nylén et al. 2007). A correlação positiva entre os níveis de LPS e a citocina MIF está de acordo com relatos anteriores de que esta é liberada após vários estímulos, entre eles a endotoxemia (Bacher et al. 1996). Como a liberação de MIF aumenta a expressão de TLR-4 (Roger et al. 2001), um importante receptor do LPS, acreditamos que os altos níveis de MIF podem aumentar a suscetibilidade das células à estimulação pelo LPS, contribuindo para intensificar a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Calandra et al. 2003). A correlação positiva entre os níveis de LPS e IL-6 e IL-8 observadas no presente estudo é consistente com esta ideia,

uma vez que o MIF também induz a produção de outros mediadores inflamatórios (Calandra et al. 2003).

É importante ressaltar que a presença de níveis elevados de LPS nos pacientes de LV pode ser uma consequência da falha dos mecanismos naturais de controle da translocação microbiana que ocorre em níveis basais ou mesmo uma falha na sua eliminação pelos macrófagos residentes do trato gastrointestinal ou do fígado (Brenchley & Douek. 2012). Tal possibilidade pode ser verdadeira, principalmente se considerarmos que tais células são alvo do parasitismo pela *L. infantum* e podem apresentar um comprometimento da função fagocítica ou mesmo já terem alcançado uma saturação desta capacidade. Simultaneamente, pode ser que o tempo de avaliação após o tratamento ainda não tenha sido o suficiente para a normalização desses produtos microbianos na circulação. No entanto, os níveis de IFABP mais elevados em relação aos saudáveis, assim como a correlação com o LPS, sugerem um dano intestinal. Estudos em andamento pelo nosso grupo com modelo experimental poderão esclarecer a ocorrência do fenômeno da translocação microbiana na LV e se ocorre algum tipo de dano na mucosa intestinal que possa ser associado à presença de LPS no local ou na periferia.

A ideia de que os componentes do parasito estão envolvidos nas anormalidades imunológicas observadas na LV, seja nos mecanismos supressores ou nos ativadores, permanece em investigação. Somado a isso, a possibilidade de que o parasitismo intestinal concomitantemente à depleção de células T pode comprometer o GALT em pacientes com LV e permitir a translocação microbiana, adiciona um novo conceito a essa complexa interação entre o parasito de tropismo viscerotrópico e o hospedeiro. O fato é que a presença do LPS proveniente de bactérias gram-negativas, ao lado dos antígenos de *Leishmania* pode contribuir para a hiperativação do sistema imune e aponta para os possíveis benefícios da profilaxia antibacteriana ao lado da terapia leishmanicida.

A translocação microbiana também está envolvida na patogênese de várias doenças não infecciosas, como a doença inflamatória do intestino (Harrison et al. 2011) e a doença do enxerto versus hospedeiro (Cooke et al. 2002). No que se refere às doenças infecciosas, além da infecção pelo HIV-1 e da LV, a função estimulatória exercida pelo LPS foi demonstrada apenas nas hepatites B e C (Sandler et al. 2011). Na verdade, acreditamos que qualquer doença cujo substrato patogênico envolva danos à barreira gastrointestinal e mudanças na sua arquitetura, pode resultar na passagem de produtos

microbianos para a circulação. Neste cenário, doenças parasitárias como giardíase, amebíase, estrongiloidíase e outras podem evoluir com esse quadro e merecem atenção.

Posteriormente, levando em consideração os dados acima discutidos sobre o grau de ativação linfocitária e de liberação das citocinas pró-inflamatórias estarem relacionados à presença do LPS na LV, buscou-se investigar o que poderia ocorrer num cenário de sobreposição com a infecção pelo HIV-1. Ao mesmo tempo, avaliamos a carga parasitária desses pacientes coinfectados, a fim de entender se a manutenção da ativação do sistema imune durante a remissão clínica da LV (documento 1) poderia ser atribuída à persistência de níveis elevados do parasito.

A avaliação dos pacientes coinfectados durante a fase ativa da LV também revelou elevados níveis de ativação mesmo naqueles cuja carga viral já se apresentava indetectável devido à TARV (documento 4), sugerindo que o grau de ativação é independente da fase clínica da LV, uso de TARV e do tratamento anti-*Leishmania*. Considerando que paradoxalmente a LV cursa com uma ativação policlonal e com um perfil misto de citocinas durante a fase ativa da doença, não seria inesperado verificar uma potencialização do fenômeno da ativação nesses pacientes (documento 4). Ao lado disso, a própria replicação parasitária na fase ativa e sua persistência na remissão clínica poderiam contribuir para os resultados encontrados.

Interessantemente, a quantificação da carga parasitária através do gene MAG-1 revelou que estes níveis foram mais elevados na fase ativa da doença em relação à remissão clínica. Dentre os nove pacientes coinfectados tratados avaliados, cinco mostraram formas parasitárias no sangue abaixo do limite de detecção do ensaio e os demais, apresentaram valores ainda detectáveis, porém inferiores aos da fase ativa da doença. Estes resultados sugeriram que a terapia anti-*Leishmania* contribuiu, em parte, para a diminuição da carga parasitária circulante. Por outro lado, níveis ainda detectáveis em quatro pacientes coinfectados podem sugerir que o tempo para sua normalização seja maior, conforme dados da literatura (Antinori et al. 2008). Outra forte possibilidade é que a terapia sozinha não seja o suficiente para tal e, que provavelmente o intenso grau de comprometimento imune desses pacientes não permita um controle parasitário eficiente (Casado et al. 2001). Considerando que nenhum dos pacientes avaliados neste documento 4 fizeram uso de profilaxia secundária, estudos em andamento pelo nosso grupo ajudarão a entender se sua utilização contribuirá para a supressão da carga parasitária circulante e uma diminuição das frequentes reativações da LV.

Além disso, mesmo com uma terapia específica bem sucedida e com os níveis de carga parasitários baixos ou indetectáveis periféricamente, sabe-se que a permanência do parasito na medula óssea (Antinori et al. 2008) ao lado do comprometimento imune de pacientes concomitantemente infectados pelo HIV-1 pode ser responsável pela contínua estimulação antigênica e frequentes reativações (Cota et al. 2011). Nossos resultados, entretanto, mostraram que o número estimado de formas promastigotas/por mL de sangue se correlacionou com a ativação linfocitária apenas na fase ativa da doença. Por outro lado, àqueles na remissão clínica apresentaram um alto percentual de linfócitos T ativados independente da carga parasitária, apontando para a existência de outros cofatores para a ativação celular.

De fato, os níveis de LPS estavam elevados nos pacientes LV/HIV-1 tanto na fase ativa quanto na remissão clínica, coerente com o *status* de ativação imune nestes dois momentos clínicos. Entretanto, tais níveis não diferiram em comparação aos casos de HIV-1 apenas. Quando todos os indivíduos infectados pelo HIV-1 foram avaliados conjuntamente observou-se uma correlação positiva entre os níveis de LPS e sCD14 e IFABP, indicando que o dano intestinal pode estar envolvido na passagem desses produtos microbianos e que estes, uma vez na circulação, são capazes de estimular as células do sistema imune (Brenchley et al. 2006b). A correlação positiva *borderline* entre os níveis de IFABP e o percentual de células T ativadas também sugere o dano intestinal com um papel indireto neste processo de ativação sistêmica.

O fato dos níveis de LPS não estarem mais elevados na coinfeção *Leishmania*/HIV-1 nos chamou a atenção e pode sugerir que a infecção pelo HIV-1 possa ter sido o suficiente para induzir a translocação de produtos microbianos nesses pacientes ao ponto destes não aumentarem mais, apesar da existência de outro patógeno no local que possa contribuir para o dano. No entanto, é importante ressaltar que a similaridade entre esses grupos quanto aos níveis plasmáticos de LPS não nos informa absolutamente nada sobre o comprometimento gastrointestinal *in situ*. Os níveis de IFABP sugerem o dano intestinal, uma vez que uma proteína localizada no citosol das células desse tecido está aumentada na circulação sistêmica, porém para determinar diretamente o comprometimento da mucosa intestinal, fragmentos de tecido local precisariam ser avaliados. Estes e colaboradores (2010) observaram interrupções na barreira intestinal de macacos *rhesus* infectados com SIV através da coloração da proteína claudina nas junções do tipo *tight*. A microscopia confocal mostrou que tais interrupções estavam associadas à

translocação de produtos microbianos para a lâmina própria. Dessa maneira, é possível que a extensão do dano mucoso entre os grupos seja diferente, ou mesmo se correlacione com o grau de translocação microbiana no sítio anatômico, mas não necessariamente com os níveis plasmáticos de LPS. Por questões éticas é extremamente difícil a obtenção de fragmentos de tecido da mucosa intestinal, o que torna difícil inferir o verdadeiro grau de comprometimento imune do GALT nesses pacientes coinfectados e mesmo nos monoinfectados para LV.

Alternativamente, a ausência de diferença também pode ter ocorrido porque os níveis plasmáticos dosados foram apenas da molécula LPS, mas sabidamente outros componentes bacterianos são passíveis de translocação, como peptidoglicano, ácido lipoteicóico e flagelos (Brenchley & Douek. 2008). Assim, a quantificação do DNA ribossomal (16S) bacteriano no plasma dos pacientes coinfectados poderá informar se os níveis totais de componentes bacterianos podem estar aumentados nos indivíduos coinfectados e, conseqüentemente contribuindo para a ativação imune sistêmica.

Apesar de aparentemente os níveis de LPS terem alcançado um platô nos pacientes coinfectados, eles se correlacionaram com o percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando CD38 ao lado da infecção por *Leishmania*, que já havia sido associada aos níveis de ativação no documento 1, discutido inicialmente. Esse fato aponta outro potencial cofator na estimulação imune sistêmica de pacientes coinfectados. Além disso, conforme esperado, observamos uma potencialização do *status* ativado e inflamatório nos pacientes de coinfecção, independentemente da fase clínica da LV. Os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IFN- $\gamma$  e TNF podem contribuir para a maior ativação de monócitos/macrófagos, consistente com os níveis mais elevados de sCD14 no plasma dos pacientes coinfectados em relação aos demais grupos. Considerando que na infecção pelo HIV-1 a enteropatia é causada inicialmente pela intensa exposição e replicação viral (Brenchley et al. 2004, 2006b) e mantida na fase crônica pela intensa ativação do sistema imune (Douek et al. 2009), podemos dizer que o conhecido círculo vicioso pode estar agravado na coinfecção LV/HIV-1. Assim, a produção direta de citocinas inflamatórias pelos estímulos patogênicos (virais e parasitários) e/ou pelo LPS ou indiretamente pelo próprio grau de ativação do sistema imune, acaba por sustentar e agravar tal processo.

Nossos dados indicaram que a associação *Leishmania*/HIV resulta num efeito sinérgico *in vivo*, no qual os percentuais de linfócitos T ativados e os níveis de citocinas

inflamatórias liberados diferem daqueles encontrados em cada uma das duas infecções isoladamente (Valdez et al. 1997, Connolly et al. 2005, Peruhype-Magalhães et al. 2006, Nylén et al. 2007). Tal efeito está diretamente relacionado aos níveis de LPS plasmáticos e às consequências imunopatogênicas da infecção por *L. infantum*. Estudos futuros serão necessários para esclarecer os efeitos da persistente ativação sobre a funcionalidade dos linfócitos T na resposta imune a esses patógenos.

Um das principais consequências da profunda ativação do sistema imune causada por mecanismos direta ou indiretamente relacionados ao HIV-1 são as contínuas taxas de proliferação celular e acúmulo de células terminalmente diferenciadas (Appay et al. 2002, Papagno et al. 2004). Após inúmeras replicações, estas células perdem sua capacidade proliferativa e ficam mais suscetíveis à morte celular por apoptose (Appay et al. 2008). Tal falha vem sendo atribuída ao fenômeno da senescência, caracterizada por um encurtamento do telômero, devido aos inúmeros ciclos celulares sofridos, diminuição da atividade da telomerase, diminuição da produção de IL-2 e perda da expressão dos receptores coestimulatórios CD27 e CD28 (Appay et al. 2008).

Apesar de Brenchley e colaboradores (2003) terem descrito que a molécula CD57 por si só é capaz de prever a senescência das células, e, portanto sua instabilidade replicativa, este mesmo estudo verificou que dentre os linfócitos T CD57<sup>+</sup>, podemos encontrar células em vários momentos diferentes da diferenciação celular, tais como células *naive*, memória central (T<sub>MC</sub>) e memória efetora (T<sub>ME</sub>). Deste modo, decidimos que o resultado proveniente do *dot plot* de células simultaneamente CD57<sup>+</sup> e CD27<sup>-</sup> era mais fidedigno, no sentido de avaliar os níveis de células senescentes já no seu estágio final de diferenciação (após a perda da expressão de CD27) e, portanto tal análise também foi considerada em adição ao percentual de células T CD57<sup>+</sup> totais.

Coerente com o elevado grau de ativação celular observado nos pacientes LV/HIV-1 verificamos que o percentual de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que expressaram a molécula CD57 e/ou coexpressaram CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> foi significativamente mais elevado nos pacientes coinfectados em relação ao grupo de indivíduos saudáveis, cuja mediana de idade foi similar, já que a imunosenescência também aumenta com a idade. Assim, podemos sugerir que tal fenômeno não só ocorre nos pacientes de LV/HIV-1, como também está mais acelerado. O denominador comum deste agravo em ambos os indivíduos, saudáveis ou infectados pelo HIV-1 é a perda da competência imune e uma espécie de limiar, acima do qual o risco de infecções oportunistas torna-se extremamente elevado (Focosi et al. 2010).



Entretanto, a partir do momento que tais níveis estão mais altos no grupo de pacientes coinfectados isto poderia favorecer o aparecimento e/ou reaparecimento de uma LV que estava sendo mantida, até então, sob controle do sistema imune.

Ao mesmo tempo em que a imunosenescência elevada pode favorecer o aparecimento de infecções oportunistas, as coinfeções capazes de aumentar o estado geral de ativação imune, entre elas a LV, também podem contribuir para acelerar o envelhecimento do sistema imune. De fato, já foi observado que o percentual de células senescentes (T CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>) em indivíduos infectados pelo HIV-1 soropositivos para CMV estava mais elevado quando comparado aos pacientes soronegativos para este vírus (Evans et al. 1999). Além disso, todas as células senescentes eram CD28<sup>-</sup>, indicando o estágio final de diferenciação em que estas se encontravam (Evans et al. 1999). Tal fenótipo foi independente da carga viral e do *status* clínico do paciente.

Apesar dos níveis de ativação (CD38<sup>+</sup> em T CD8<sup>+</sup>) serem mais elevados nos pacientes LV/HIV-1 tanto na fase ativa quanto na remissão clínica (documento 1 e 4) e permanecerem elevados ao longo do acompanhamento clínico (documento 2), o percentual de células senescentes/diferenciadas não se mostrou potencializado nos indivíduos LV/HIV-1, quando comparado aos casos de HIV-1, sem leishmaniose. No entanto, é importante destacar que alguns fatores podem ter contribuído para a ausência de diferenças, entre eles a maior depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> verificada nesses pacientes de LV/HIV-1, independente da fase clínica da LV (documentos 1 e 2). Além disso, conforme mostrado no apêndice de resultados, os níveis de T CD4<sup>+</sup> são baixos na fase ativa da doença e assim permanecem apesar da TARV e do tratamento para *Leishmania* na maioria dos pacientes avaliados (nove pacientes permanecem com contagens abaixo de 300 células/mm<sup>3</sup> no pós-tratamento).

Outro fato que corroborou para esse raciocínio foi o fato de verificarmos que os indivíduos com os maiores percentuais de células senescentes e diferenciadas (CD57<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) em T CD4<sup>+</sup> também foram os que apresentavam a menor contagem absoluta de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, indicando que quanto maior o percentual de senescência, maior o grau de imunossupressão e avançado estado de comprometimento imunológico nesses pacientes coinfectados. Essa observação nos faz pensar até que ponto o elevado grau de imunosenescência desses pacientes coinfectados pode contribuir para a reconstituição imunológica ineficiente, uma vez que estas células senescentes ficam mais suscetíveis à morte celular espontânea ou mesmo àquela induzida por ativação (Palmer et

al. 2005, Corbeau & Reynes. 2011). Da mesma maneira, o percentual de células senescentes em T CD8<sup>+</sup> não diferiu entre os grupos infectados pelo HIV-1. Embora não tenhamos determinado o número de células apoptóticas, é possível que a ativação celular mais elevada nos pacientes coinfetados também possa estar contribuindo para esse processo de morte, explicando a ausência de diferenças entre esses grupos.

Apesar dos níveis de senescência em T CD8<sup>+</sup> não terem sido mais elevados nos pacientes coinfetados em relação aos casos de HIV-1 apenas, algumas questões importantes foram observadas. Primeiramente, tal percentual de células senescentes (CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) é significativamente mais elevado nesta subpopulação do que na de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Este achado está de acordo com o que vem sendo mostrado na literatura (Champagne et al. 2001, Brenchley et al. 2003, Papagno et al. 2004), principalmente por ser esta a principal subpopulação efetora na infecção pelo HIV-1, capaz de passar por contínuas expansões após a ativação e estabelecer um *pool* de células de memória efetora, enquanto as células T CD4<sup>+</sup> ativadas tendem a morrer mais rapidamente (Appay et al. 2008). De fato, indivíduos infectados pelo HIV-1 apresentam ainda na fase aguda da infecção um aumento do número de células T CD8<sup>+</sup> na periferia, o que pode ser um reflexo, em parte, da montagem inicial de uma resposta antiviral. Entretanto a manutenção desse percentual elevado durante a fase assintomática está mais associada ao processo de ativação já descrito no HIV-1 (Douek et al. 2009). Considerando o intenso grau de ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos pacientes LV/HIV-1, o maior percentual de células senescentes vai de encontro ao fato de que tal processo contribui para a maior taxa de diferenciação e senescência dessa subpopulação celular. Mais recentemente, Appay e colaboradores (2007) verificaram que a proporção de células T terminalmente diferenciadas era mais elevada na subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> quando comparada a T CD4<sup>+</sup> e, como essas células são as que geralmente expressam CD57, pressupõem-se que a senescência seja mais elevada nesta população de T CD8<sup>+</sup>.

Em segundo lugar, este percentual de células T CD8<sup>+</sup> senescentes permaneceu elevado independente das contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, isto é, mesmo aqueles pacientes que mostraram alguma recuperação dos valores de T CD4<sup>+</sup> após o tratamento (Figura 1A), a senescência permaneceu elevada, consistente com o grau de ativação observado ainda em pacientes na remissão clínica da leishmaniose. Ainda neste contexto, três pacientes do acompanhamento prospectivo que apresentaram um incremento dos seus níveis de T CD4<sup>+</sup> (Pt1, Pt2 e Pt3), mantiveram níveis elevados de células T CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> em T CD8<sup>+</sup>.

De forma esperada, o percentual de células senescentes totais e senescentes diferenciadas diferiu entre os pacientes de LV/HIV-1 e àqueles com LV, sem HIV-1, na fase ativa da doença em ambas as subpopulações de linfócitos T. Interessantemente, tal diferença não foi significativa entre os grupos nos pós-tratamento. Este resultado está de acordo com o fato da infecção pelo HIV-1 acelerar a imunosenescência desses indivíduos (Appay et al. 2007). Embora o percentual de células senescentes dos pacientes de LV ativos não diferiu do encontrado nos saudáveis, observou-se uma diferença significativa entre estes grupos após o tratamento e com a recuperação dos níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Isso pode ser compatível com as etapas de uma resposta imune efetora, com diferenciação, expansão e conseqüente perda da capacidade proliferativa de algumas células envolvidas no controle do parasito. A persistência do estado de ativação imune nesses pacientes de LV cerca de seis meses após o tratamento anti-*Leishmania* também pode contribuir para a diferença em relação aos saudáveis. O acompanhamento prospectivo desses pacientes poderá informar se longo tempo após o tratamento específico, o percentual de células senescentes retorna para níveis similares aos de um indivíduo saudável. Conforme mostrado no documento 4, a carga parasitária diminuiu nos pacientes tratados de LV e, portanto, embora este, mesmo sob controle, possa manter a contínua estimulação e diferenciação de células T, outros elementos como o LPS também podem estar envolvidos neste processo.

Ao analisarmos o percentual de células CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> nas subpopulações de linfócitos T, verificamos que este fenótipo de células senescentes, mas já diferenciadas, constituía cerca de metade do percentual de células CD57<sup>+</sup> totais em T CD4<sup>+</sup> e mais da metade em T CD8<sup>+</sup>, o que aponta primeiramente para o intenso grau de células altamente diferenciadas nesses pacientes coinfectados, conforme os resultados da literatura já vêm mostrando para indivíduos infectados pelos HIV-1 (Appay et al. 2002, Papagno et al. 2004). Ao mesmo tempo, também indicam a existência de células já senescentes, e, portanto, com a capacidade replicativa comprometida, em um estágio inicial ou intermediário da diferenciação ou mesmo de células *naive* (CD57<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), o que pode representar um importante papel na patogênese dessas duas infecções. De fato, já foi demonstrado que a repetida estimulação antigênica na infecção pelo HIV-1 pode levar à exaustão da capacidade proliferativa de células que ainda não se diferenciaram completamente (Appay et al. 2007). Recentemente, um estudo verificou que pacientes infectados pelo HIV-1 apresentavam um acúmulo de células T CD8<sup>+</sup> no estágio intermediário da diferenciação (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>), enquanto que as células T CD4<sup>+</sup>

progrediram para um estágio mais avançado (CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>). Em ambas as subpopulações, o percentual de células senescentes foi elevado (Mojumdar et al. 2012).

Por fim, embora já existam células senescentes que não se diferenciaram totalmente (CD57<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) nos pacientes coinfectados, este percentual é significativamente mais baixo do que o percentual de células T CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>, conforme mostrado no apêndice de resultados. Tal achado suporta a ideia anterior de que quando as células T se diferenciam, ocorre a perda sequencial dos receptores CD27 e CD28 (Papagno et al. 2004) e elas passam a expressar a molécula CD57. Na verdade, existe um intenso relacionamento entre ativação, diferenciação celular, e posterior senescência replicativa, que já foi demonstrado *ex vivo* e *in vivo* para diferentes infecções virais crônicas, como EBV, CMV e HIV-1 (Appay et al 2002, Papagno et al. 2004). É razoável pensar que esse mesmo processo possa estar ocorrendo na coinfeção LV/HIV-1, mediante a potencialização dos níveis de ativação celular detectados.

É interessante destacar que tais níveis de células senescentes/diferenciadas em ambas as subpopulações de células T permaneceram inalterados nos pacientes coinfectados após o tratamento para *Leishmania* e apesar do uso do TARV. Coerente com estes resultados, os pacientes coinfectados de LV/HIV-1 não apresentaram uma correlação positiva entre os níveis de senescência e carga viral plasmática em nenhum dos dois momentos clínicos avaliados (ativo e pós-tratamento), ou seja, apesar dos níveis de RNA plasmático do HIV-1 estarem baixos ou indetectáveis, o percentual de células T senescentes/diferenciadas foi elevado. Nossos resultados estão de acordo com outros trabalhos da literatura (Brenchley et al. 2003, Palmer et al. 2005), embora seja importante ressaltar que a maior suscetibilidade das células senescentes à morte induzida por ativação possa mascarar uma correlação positiva com a carga viral plasmática.

Dessa maneira, a TARV pode não influenciar nos níveis de senescência, mas ao manter sob controle os níveis de carga viral plasmática (indetectáveis), ratifica que a ativação do sistema imune por outros mecanismos que não os diretamente relacionados ao vírus possam estar ajudando a manter o grau de imunosenescência. No presente estudo, a infecção por *Leishmania* e o potencial estimulatório do LPS poderiam ser apontados como os mantenedores deste fenômeno, já que foram associados aos níveis mais elevados de ativação em pacientes de LV/HIV-1 (documento 4). O papel da ativação celular na indução e manutenção do fenômeno da imunosenescência foi observado preliminarmente, através de uma correlação positiva entre o percentual de células CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> em T

CD8<sup>+</sup> e o grau de senescência nesses linfócitos nos pacientes avaliados prospectivamente (dados não mostrados).

O mesmo raciocínio pode ser utilizado, a princípio, para a influência da carga parasitária, uma vez que esta pode se apresentar reduzida após longo tempo do término do tratamento anti-*Leishmania* na presença de níveis ainda elevados de ativação celular (documento 4). No entanto, tal hipótese só poderá ser esclarecida quando realizarmos a quantificação parasitária nos pacientes coinfectados desta casuística atual em acompanhamento.

É importante destacar que o percentual de células senescentes nas duas subpopulações de linfócitos T não diferiu entre os pacientes que reativaram e àqueles que se mantiveram em remissão clínica, sugerindo que apesar da possibilidade de exaustão clonal, diferenças não só no perfil funcional, mas também na qualidade da resposta imune específica a esses patógenos podem ajudar a entender este fato. Neste contexto, alguns trabalhos relataram que essas células senescentes são em sua maioria células T<sub>ME</sub>, cuja característica principal é a fraca capacidade de proliferar frente a mitógenos e ao vírus, mas com alta capacidade efetora de produção de citocinas (IFN- $\gamma$ ) e granzima, no caso de células T citotóxicas, após o encontro com o antígeno, ajudando no controle da replicação viral (Brenchley et al. 2003, Papagno et al. 2004, Palmer et al. 2005, Chattopadhyay et al. 2009). Por outro lado, outros pesquisadores consideram que estas células senescentes por terem perdido a capacidade de proliferarem, apenas se acumulam e contribuem para o envelhecimento da população de células T (Appay & Rowland-Jones. 2002).

Resultados anteriores de nosso grupo mostraram que os pacientes LV/HIV-1 (ativos e em remissão) apresentaram altos níveis de células T<sub>ME</sub> circulantes em T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (Santos-Oliveira. 2008), em comparação aos pacientes monoinfectados de HIV-1 ou LV. Levando em consideração o fato dessas células T<sub>ME</sub> não proliferarem bem, acreditamos que a maioria delas, senão todas, também estejam expressando a molécula CD57. Estudos posteriores avaliando não só a coexpressão de CD57 e moléculas associadas ao fenótipo de memória (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>), mas também a qualidade dessa resposta poderão ajudar a entender as diferenças entre longos períodos de remissão clínica e as reativações, apesar do grau de senescência.

O perfil fenotípico de uma célula T efetora protetora ainda é bastante controverso. Alguns autores acreditam que a imunidade protetora está associada à capacidade proliferativa de células T CD8<sup>+</sup> específicas e com perfil de célula inicialmente diferenciada

(Migueles et al. 2002), o que desafiaria a visão de que células altamente diferenciadas e portanto, senescentes replicativamente, seriam boas células efectoras. Uma vez que o percentual de células senescentes foi similar entre os pacientes coinfetados e os casos de HIV-1 apenas, futuros estudos avaliando a qualidade da resposta imune frente aos antígenos específicos de *L.infantum* e p24, através do perfil de citocinas produzidas (em especial IFN- $\gamma$  e/ou IL-2) serão indispensáveis para entender se estas células senescentes/diferenciadas possuem algum impacto na imunopatogenia da coinfeção LV/HIV-1, retardando a progressão para a AIDS e evitando as reativações ou se apenas se acumulam na periferia e contribuem para o colapso do sistema imune.

A avaliação anterior da reatividade linfocitária frente aos Ag-Li e Ag-p24 através de ensaios de resposta linfoproliferativa revelou que os pacientes coinfetados (ativo e em remissão) foram capazes de responder frente ao mitógeno, mas nenhuma resposta foi observada nos poços de cultura estimulados com antígenos parasitário e viral (Santos-Oliveira. 2008). As baixas contagens de T CD4<sup>+</sup> na coinfeção, ou ainda a má qualidade funcional no *pool* de células restantes, podem ter contribuído para a ausência de resposta específica aos antígenos. Aliado a isso, o elevado percentual de células T senescentes dos pacientes em comum a essas duas análises pode ajudar a entender, em parte, a ausência de proliferação *in vitro* frente aos antígenos específicos. Além da senescência, a morte dos clones por exposição repetida ao antígeno específico pode ter contribuído para a ausência de resposta proliferativa. Apesar dos níveis de proliferação dessas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> senescentes não terem sido analisados nessa casuística atual, acreditamos que a capacidade proliferativa já estivesse comprometida. De fato, células T CD4<sup>+</sup> de doadores saudáveis que expressavam a molécula CD57 proliferaram menos frente ao mitógeno quando comparadas às células CD57<sup>-</sup>, cujo fenótipo foi CFSE<sup>low</sup> (Palmer et al. 2005).

Resultados preliminares de apenas três pacientes acompanhados prospectivamente (Pt1, Pt2 e Pt3) mostraram que o percentual de células T CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> parece não se alterar prontamente após o cultivo por 72 horas, uma vez que tais níveis foram similares entre o percentual *ex vivo* e o poço não estimulado, em ambas as subpopulações de células T. Entretanto, frente aos estímulos específicos de *L.infantum* e p24, o percentual de células senescentes variou em relação ao poço não estimulado, sugerindo que a ativação induzida pelo estímulo pode aumentar a senescência em T CD4<sup>+</sup>. Diferentemente, o percentual de células senescentes em T CD8<sup>+</sup> não variou frente aos estímulos antigênicos, o que pode ser devido ao elevado percentual de células já senescentes *ex vivo*, apontando para a

incapacidade proliferativa das possíveis células respondedoras. Dessa maneira, uma vez que apenas as células CD57<sup>+</sup> ainda possuem a capacidade de proliferar, a possibilidade de existir um clone respondedor a um desses dois estímulos nesse *pool* de células deve ser levada em consideração.

Em conclusão, podemos dizer que molécula CD57 expressa na superfície dos linfócitos T pode ser utilizada como uma estimativa geral da qualidade da competência imune nesses pacientes coinfectados e a presença de altos percentuais de células senescentes *ex vivo* na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, sejam eles CD57<sup>+</sup> totais ou já diferenciados (CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) refletem um sistema imune cronicamente ativado que não se modifica apesar da TARV e do tratamento anti-*Leishmania*. Além do estudo transversal, os resultados iniciais do acompanhamento clínico prospectivo também mostraram que o tratamento específico para a LV e o uso da profilaxia secundária não proporcionaram uma diminuição dos níveis de senescência, nem evitaram a reativação de três pacientes. Pelo contrário, o percentual de células senescentes tende a aumentar em três pacientes na população de T CD4<sup>+</sup> e se mantém idêntico em T CD8<sup>+</sup>. Isso pode estar consistente com a questão da exaustão imune irreversível, na qual a intensa depleção de células T CD4<sup>+</sup> e o acúmulo de células altamente senescentes/diferenciadas e altas taxas de morte celular induzida por ativação só podem ser revertidos pela geração de novas células pelo timo (Appay et al. 2008). Considerando a intensa ativação do sistema imune a que estes pacientes coinfectados estão submetidos, acreditamos que o *output* tímico também deve estar comprometido, suprindo de maneira ineficiente a periferia com novos clones de T CD4<sup>+</sup>. A posterior avaliação do percentual de células TREC<sup>+</sup> serão esclarecedores neste sentido.

Neste cenário de imunodepressão causado pelo HIV-1 e pela *L.infantum*, ao lado de uma intensa ativação do sistema imune, imunosenescência e pobre reconstituição imunológica, apesar da TARV foi realizada a avaliação do repertório V $\beta$  dos linfócitos T de 13 pacientes coinfectados na fase ativa da doença e de 12 pacientes logo após o tratamento para *Leishmania*. Tal análise caracterizou o perfil de distribuição das famílias V $\beta$  nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> separadamente, bem como mostrou que o grau de comprometimento imune periférico na coinfecção pode repercutir no perfil do repertório circulante. Além disso, a análise do repertório num momento posterior ao tratamento para *Leishmania* nos permitiu avaliar a influência dessa terapia na dinâmica de utilização dessas cadeias.

Primeiramente, foram avaliados os repertórios TCRV $\beta$  em T CD4<sup>+</sup> e em T CD8<sup>+</sup> nos 13 indivíduos sadios incluídos no estudo, a fim de definir os percentuais medianos de normalidade da utilização dessas cadeias na periferia. A análise por citometria de fluxo mostrou que em ambas as subpopulações de linfócitos T algumas famílias foram mais utilizadas, como V $\beta$ 2, V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 8 e V $\beta$ 17 em relação às demais cadeias, assim como V $\beta$ 4, V $\beta$ 11, V $\beta$ 18 e V $\beta$ 23 foram utilizadas por menos de 1% dos linfócitos T. Isso nos sugere um perfil não aleatório já que determinadas famílias tanto em T CD4<sup>+</sup> quanto em T CD8<sup>+</sup> tendem a ser preferencialmente utilizadas em detrimento de outras, estando de acordo com alguns trabalhos anteriores (Grunewald et al. 1991, Malhotra et al. 1992). Nossos resultados também estão de acordo com os valores referenciais fornecidos pelo próprio fabricante dos reagentes utilizados (Beckman Coulter), os quais cobrem cerca de 70% das células expressando TCR $\alpha\beta$  e também relataram percentuais similares de utilização das mesmas famílias encontradas em nosso estudo.

Além disso, algumas diferenças também foram observadas quando as duas subpopulações de linfócitos T foram comparadas. De acordo com um trabalho anterior de nosso grupo, o qual utilizou outra população de indivíduos saudáveis, nós igualmente verificamos que o V $\beta$ 5.1 e o V $\beta$ 12 eram mais utilizados por T CD4<sup>+</sup> e o V $\beta$ 23 por T CD8<sup>+</sup> (Giacioia-Gripp et al. 2005). Além dessas famílias, outras cadeias também foram mais utilizadas por T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, similarmente a dados anteriores da literatura (Rebai et al. 1994, Melenhorst et al. 2002, Giacioia-Gripp et al. 2005).

A influência dos genes do HLA na determinação do repertório TCRV $\beta$  deve ser levada em consideração e já foi observada anteriormente (Alkolkar et al. 1993). Consistente com a importância do HLA, Rebai e colaboradores (1994) verificaram a ausência de qualquer diferença significativa na distribuição das famílias V $\beta$  no repertório T de gêmeos monozigóticos (geneticamente idênticos). Considerando tal influência, podemos entender o porquê de algumas diferenças encontradas no percentual de utilização de algumas cadeias V $\beta$  entre os indivíduos sadios, justificando muitas vezes o alto intervalo interquartil (apêndice de resultados). Em adição, outros genes, assim como fatores ambientais ou mesmo do local onde se vive podem contribuir para essas diferenças.

O repertório TCRV $\beta$  dos pacientes infectados pelo HIV-1 é bem descrito na literatura e em geral perturbações importantes já são detectadas durante a fase aguda da infecção (Pantaleo et al. 1994, 1997a). A magnitude dessas perturbações no repertório V $\beta$  de células T CD8<sup>+</sup>, em especial, está relacionada à taxa de progressão da doença. Aqui, o



repertório de seis pacientes infectados pelo HIV-1 também revelou algumas diferenças em relação aos sadios, apesar do uso de TARV há pelo menos um ano. Embora as famílias mais utilizadas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> desses pacientes tenham permanecido as mesmas já observadas para os sadios, as reduções significativas podem sugerir o quanto o comprometimento imune com baixos níveis de T CD4<sup>+</sup> e ativação linfocitária podem contribuir para as perturbações encontradas. Entretanto, é importante destacar que apesar dessas reduções em relação ao grupo de sadios e da subutilização de algumas outras cadeias, não se notou a ausência completa de nenhuma delas. Este fato é consistente com a visão atual de que a subutilização de algumas famílias V $\beta$  na infecção pelo HIV-1 pode ser causada pela exaustão/depleção de alguns clones de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, seja por mecanismos direto ou indiretamente relacionado à replicação viral (Pantaleo et al. 1997b, Westby et al. 1998). Esta ideia é diferente daquela inicial onde se acreditava que algumas proteínas virais possuíam propriedades superantigênicas capazes de deletar clones com um determinado V $\beta$  (Hodara et al. 1993, Soudeyns et al. 1993).

Por outro lado, o repertório TCRV $\beta$  dos pacientes infectados pelo HIV-1 utilizou de modo mais significativo a cadeia V $\beta$ 3 nas células T CD8<sup>+</sup> em relação aos sadios. Esta cadeia também se destacou no repertório de T CD4<sup>+</sup> com mais de 5% de utilização. Além disso, V $\beta$ 12 também se destacou em T CD4<sup>+</sup> quando comparado aos sadios. Estudos anteriores de nosso grupo também já tinham observado que a cadeia V $\beta$ 3 era mais utilizada pelas subpopulações de células T após 24 semanas de TARV em comparação ao período pré-TARV (Giacchia-Gripp et al. 2005), bem como V $\beta$ 12 se destacava em relação ao grupo de sadios (Gioavannetti et al. 2003). Assim, embora uma normalização completa dos níveis de utilização das cadeias V $\beta$  também não tenha sido verificada nos casos de HIV-1 aqui avaliados (Connors et al. 1997, Gorochov et al. 1998), eles se assemelharam, em parte, com o que foi visto anteriormente em pacientes com longo tempo de TARV (Giacchia-Gripp et al. 2005, Gioavannetti et al. 2003).

Neste estudo, o perfil de distribuição das famílias V $\beta$  não pôde ser definido para os casos de HIV-1, pois os pacientes só foram avaliados em um único momento, mas adotando a terminologia “símile”, poderíamos dizer que os pacientes apresentaram perfis oligo ou policlonais-símile nas duas subpopulações de linfócitos T, o que pode refletir o longo tempo de TARV. De modo geral, os casos de HIV-1 em terapia tendem a apresentar um perfil oligoclonal de distribuição do repertório, porém com mobilizações de segmentos V $\beta$  diferentes daqueles observados antes do tratamento, o que poderia sugerir o

aparecimento de linfócitos T com especificidades diferentes ou a simples expansão de clones já existentes (Giovannetti et al. 2003, Giacoia-Gripp et al. 2005).

A natureza das subpopulações de linfócitos T quanto à utilização do TCRV $\beta$  tem sido foco de estudo de outras doenças infecciosas ou não, como hepatite B (Moebius et al. 1990) e esclerose múltipla (Kotzin et al. 1991). No entanto, a caracterização do perfil de distribuição das famílias V $\beta$  em indivíduos apenas com LV, ainda é desconhecida. Os trabalhos já descritos na literatura sobre este tema foram abordados em pacientes com LC (Clarêncio et al. 2006, Karinimia et al. 2007). No presente estudo, quatro casos de LV na fase ativa e no pós-tratamento (cerca de até seis meses depois) foram avaliados, uma vez que o aparecimento de alguma família no repertório dos pacientes coinfectados poderia refletir a participação de segmentos V $\beta$  mobilizados nos casos de LV, sem HIV-1.

De modo similar ao que já foi descrito para os sadios e para os pacientes infectados pelo HIV-1, algumas famílias também são mais utilizadas em detrimento de outras nos pacientes de LV em ambas as subpopulações de linfócitos T. No entanto, alguns membros V $\beta$  se destacaram na fase ativa da LV, não só em relação aos sadios, mas também em relação à fase pós-tratamento, sugerindo que podem ocorrer perturbações condizentes com a fase ativa da doença, como a indução de uma resposta imune, ao lado, da ausência do tratamento. Além disso, o conhecido *status* de ativação policlonal do sistema imune observado nesses pacientes de LV ativos (Goto & Prianti. 2009) também pode contribuir para a expansão de várias famílias V $\beta$  nesse momento clínico, explicando as inúmeras diferenças encontradas em relação aos sadios. De fato, o único trabalho descrito até o momento avaliando o repertório TCRV $\beta$  frente à infecção por *L. infantum* foi conduzido *in vitro* estimulando CMSP de indivíduos sadios com antígenos de membrana desse parasito. Neste estudo, a presença de vários rearranjos V $\beta$  e de diferentes comprimentos da região CDR3 do segmento V $\beta$  frente ao antígeno foi compatível com uma ação antigênica policlonal (Sassi et al. 2005). Além da própria LV, a influência dos genes do HLA também não pode ser descartada (Alkolkar et al. 1993).

Consistente com um retorno da homeostase imune após o controle do patógeno (documento 4) parece ocorrer um “esfriamento” da resposta imune com reduções nos percentuais de utilização de praticamente todas as famílias V $\beta$  após a terapia anti-*Leishmania*. De fato, apenas duas famílias (V $\beta$ 2 e V $\beta$ 18 em T CD4<sup>+</sup> e V $\beta$ 8 e V $\beta$ 18 em T CD8<sup>+</sup>) foram significativamente mais utilizadas após a terapia específica quando comparadas aos sadios, sugerindo uma tendência à normalização das perturbações

verificadas na fase ativa da doença. Esses dados também podem sugerir que o tempo pós-tratamento pode não ter sido suficiente para a completa normalização do repertório ou apontar para uma importante participação dessas cadeias na manutenção da condição de remissão clínica desses pacientes, ainda que os clones que as utilizem apresentem especificidades antigênicas diferentes. Avaliações posteriores com um número maior de indivíduos ajudarão a definir a dinâmica de utilização desses segmentos V $\beta$  na fase ativa da LV anterior ao tratamento específico, assim como na remissão clínica da LV.

De maneira interessante, a análise transversal do repertório TCRV $\beta$  nos pacientes coinfectados revelou que as famílias mais utilizadas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> refletiam exatamente o repertório dos pacientes mono infectados com HIV-1 ou LV, independente da fase clínica (ativo ou pós-tratamento) e, portanto sem diferenças entre os grupos. O mesmo ocorreu para os segmentos V $\beta$  utilizados por menos de 1% das células T CD4<sup>+</sup>. Em concordância com os resultados para os pacientes de HIV-1 e com os dados da literatura, todas as 24 famílias V $\beta$  investigadas participaram na formação do repertório do TCR dos pacientes coinfectados, independente do fato das contagens de T CD4<sup>+</sup> serem mais baixas na coinfeção LV/HIV-1.

No que se refere ao repertório utilizado pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, as perturbações foram maiores não só por não refletirem as utilizações descritas nas mono infecções, mas também porque apenas o V $\beta$ 14 foi utilizado por mais de 5% dessas células na fase ativa da LV, família esta que não se destacou nos casos de HIV-1, nem nos de LV aqui estudados. No entanto, altos percentuais de utilização dessa cadeia já foram descritos em casos de HIV-1 após 36 meses de TARV (Gioavannetti et al. 2003). Assim, V $\beta$ 14 não se constituiu em uma mobilização diferencial do repertório T CD8<sup>+</sup> frente à coinfeção e reduziu significativamente no pós-tratamento da LV. As demais famílias foram utilizadas por menos de 5% dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e pouco diferiram em relação à fase pós-tratamento.

É importante destacar que dentre os 13 pacientes coinfectados ativos, oito já se encontravam sob TARV há pelo menos seis meses, enquanto que todos os pacientes avaliados no pós-tratamento (n=12) já tinham iniciado a terapia. Além disso, estes últimos também já tinham finalizado o tratamento específico para a LV com anfotericina B e iriam iniciar a profilaxia secundária na visita seguinte ao ambulatório. Dessa maneira, podemos dizer que as poucas diferenças encontradas entre esses dois momentos clínicos, que se limitaram a quatro cadeias em T CD4<sup>+</sup> (reduções) e três em T CD8<sup>+</sup> (duas reduções e uma expansão), pode ser devido ao fato da avaliação ter sido feita logo após a finalização do

tratamento, mas também é compatível com a manutenção dos baixos níveis de T CD4<sup>+</sup>, ativação crônica do sistema imune e imunosenescência no pós-tratamento. Outra possibilidade pode ser que a terapia anti-*Leishmania* não modifique significativamente a dinâmica de utilização das cadeias Vβ pelos linfócitos T nos pacientes coinfectados tratados. Tal fato diferiu do observado para os casos de LV sem HIV-1, que tenderam à normalização em direção ao perfil apresentado pelos indivíduos saudáveis.

Quando todos os grupos foram avaliados conjuntamente, as perturbações no repertório dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> dos pacientes coinfectados em relação aos monoinfectados ficaram mais evidentes, uma vez que algumas famílias se mostraram significativamente diferentes. Ainda assim, nenhuma família se destacou de modo diferencial na coinfeção, já que as diferenças significativas encontradas entre os grupos refletiam as maiores ou menores utilizações daquelas cadeias nas monoinfecções isoladamente. Esse foi o caso, por exemplo, do Vβ13.2 que foi mais utilizado no repertório T CD4<sup>+</sup> pelos pacientes coinfectados em relação aos casos de HIV-1, coerente com o fato de essa família ter sido mais utilizada na LV. As famílias Vβ7.1 e Vβ17 foram menos utilizadas pelos pacientes coinfectados ativos em ambas as subpopulações de linfócitos T em relação aos casos de LV apenas, também coerente com o fato de serem menos utilizadas na infecção pelo HIV-1. Absolutamente consistente com um repertório em T CD8<sup>+</sup> mais alterado, sete famílias apresentaram percentuais de utilização mais baixos nos pacientes LV/HIV-1ativos em relação ao apresentado pelos casos de LV, sem HIV-1, na mesma fase clínica. Em relação aos casos de HIV-1, duas famílias diferiram, entre elas, o Vβ3, que parece participar da resposta imune frente à infecção pelo HIV-1 após a TARV (Giacchia-Gripp et al. 2005).

Mesmo sabendo que a introdução da TARV em indivíduos infectados pelo HIV-1, o mais cedo possível, poderia evitar maiores perturbações no repertório TCRVβ e, portanto contribuir para a normalização do repertório, tais alterações ainda foram vistas nos pacientes coinfectados. Isso pode estar de acordo com o fato de que pacientes concomitantemente infectados pelo HIV-1 e por *L. infantum* apresentarem importantes consequências resultantes dessa associação, as quais não se modificam apesar da TARV, como as baixas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e a intensa ativação celular (altos níveis de LPS plasmático e citocinas pró-inflamatórias). Assim as maiores perturbações em T CD8<sup>+</sup> poderiam estar refletindo o *status* comprometido e ativado do sistema imune, dos pacientes

LV/HIV-1 (documento 1 e 4), o qual culmina num processo de senescência replicativa e exaustão clonal (Appay et al. 2008).

O acompanhamento individual permitiu verificar de modo mais claro as perturbações que ocorrem no repertório V $\beta$  desses pacientes coinfectados ao longo da evolução clínica da LV. Neste presente estudo, sete pacientes incluídos no grupo de coinfectados ativos foram acompanhados até a fase logo após o tratamento. No entanto, como até o momento apenas cinco deles alcançaram longo tempo pós-terapia anti-*Leishmania*, a análise se baseou nesses casos. Dentre estes cinco pacientes, três deles se encontram em remissão clínica com oito meses pós-término do tratamento (Pt1, Pt2 e Pt3) e dois reativaram a LV cerca de seis meses depois da finalização da terapia específica (Pt4 e Pt5). Todos eles se encontravam em profilaxia secundária com anfotericina B nos momentos analisados. A exceção foi Pt1, cuja profilaxia foi retirada no último momento de avaliação devido ao aumento das contagens de T CD4<sup>+</sup> para níveis acima de 350 células/mm<sup>3</sup>.

Além das perturbações ocorridas no repertório V $\beta$ , a influência do tratamento para *Leishmania* e da TARV também puderam ser analisadas. Esse foi o caso de Pt1, cuja TARV foi iniciada com o tratamento anti-*Leishmania*. Este paciente apresentou inúmeras alterações (expansões e reduções) nas cadeias utilizadas em ambas as subpopulações de linfócitos T após o início das duas terapias específicas. No entanto, seu perfil de distribuição do repertório V $\beta$  não se modificou e permaneceu monoclonal na remissão clínica, com manutenção das famílias V $\beta$ 5.1 em T CD4<sup>+</sup> e V $\beta$ 3 em TCD8<sup>+</sup>. Esses resultados diferiram daqueles anteriores nos quais as mobilizações do tipo monoclonais durante a fase aguda do HIV-1 eram associadas a uma progressão mais rápida da doença, devido às maiores perdas de células T CD4<sup>+</sup> e maiores níveis de carga viral plasmática na fase crônica (Pantaleo et al. 1994, 1997a). Na verdade, aqui a manutenção do perfil monoclonal dominante mesmo após oito meses de tratamento em Pt1 ocorreu ao lado da queda dos níveis de carga viral plasmática para valores indetectáveis, bem como de um incremento de quatro vezes nas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Isso nos sugere que mesmo com boa resposta à TARV e ao tratamento anti-*Leishmania*, o repertório V $\beta$  ainda pode apresentar perturbações. Esses resultados estão consistentes com estudos anteriores que também mostraram restaurações variáveis do repertório e independentes dos parâmetros virológicos e imunológicos (Gorochoy et al. 1998, Connors et al. 1997, Gioavannetti et al. 2003, Malhotra et al. 2006). Entretanto, é importante notar que o tempo

de TARV pode não ter sido o suficiente para que as mudanças detectadas no repertório levassem a uma mudança de perfil na remissão clínica, no sentido de famílias utilizadas já que a diversidade clonal não foi avaliada nesse estudo.

Por outro lado, Pt2 e Pt3 que já estavam sob TARV no momento do episódio ativo de LV apresentaram poucas alterações em determinadas famílias, com um perfil policlonal em T CD4<sup>+</sup> na remissão clínica. Em relação ao repertório utilizado pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> verificou-se que apesar das pequenas perturbações ao longo do acompanhamento clínico, o perfil monoclonal anteriormente dominante (Vβ3 em Pt2 e Vβ8 em Pt3) passou a ser oligoclonal com a mobilização de mais uma família Vβ (Vβ13.2 em Pt2 e Vβ1 em Pt3). O aparecimento de novos Vβ pode sugerir que outros antígenos estão sendo foco dessas células, após o controle da carga viral e parasitária. O pequeno aumento nas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em Pt2 e Pt3 ao longo dos momentos avaliados podem ter contribuído, em parte, para o aparecimento de um perfil policlonal em T CD4<sup>+</sup> e oligoclonal em T CD8<sup>+</sup> e para a manutenção da condição de remissão clínica. Entretanto, é importante destacar que a natureza dos clones que apresentaram essas famílias não foi avaliada e, portanto não sabemos se tal fenômeno é decorrente da proliferação de células pré-existentes ou da presença de novas células T CD4<sup>+</sup> na periferia.

A redução da oligoclonalidade e o aumento da diversidade com perfis policlonais já foram observados em pacientes infectados pelo HIV-1 com boa resposta à TARV (Soudeyns et al. 2000, Romiti et al. 2001). No entanto, quando as novas famílias expandidas após 36 meses de TARV foram analisadas para o comprimento da região CDR3 e pelo sequenciamento dos nucleotídeos, verificou-se uma natureza oligoclonal da resposta, sugerindo uma incompleta normalização do repertório Vβ, apesar do aparente aumento da diversidade (Giovannetti et al. 2003).

Da mesma maneira como ocorreu com o percentual de células senescentes que não diferiu entre os pacientes que reativaram e àqueles que se mantiveram em remissão clínica, o perfil policlonal também foi observado no momento do retorno dos sinais e sintomas do episódio ativo de LV, sugerindo que a presença de um perfil policlonal não está necessariamente associada à manutenção da remissão clínica e menor progressão da doença (Pantaleo et al. 1994, 1997a). Além disso, a reativação ocorreu independentemente das contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (59 células/mm<sup>3</sup> em Pt4 e 279 células/mm<sup>3</sup> em Pt5) e da carga viral plasmática (394.000 cópias/mL em Pt4 e indetectável em Pt5), conforme observado anteriormente (Casado et al. 2001, Alexandrino-de-Oliveira et al. 2010). A

posterior quantificação da carga parasitária no sangue periférico nos esclarecerá se o parasito também pode ter contribuído para a reativação da doença nesses dois pacientes.

Outro fato importante corroborou para este pensamento de que a policlonalidade não evita a reativação. Pt4 e Pt5 já apresentavam perfis poli e oligoclonais em T CD8<sup>+</sup> respectivamente, em suas fases ativas da LV, da mesma maneira que Pt2 e Pt3 nas duas subpopulações de linfócitos T durante a remissão clínica da LV e ainda assim, as reativações ocorreram. É possível que o perfil policlonal do TCRV $\beta$  observado nesses pacientes coinfectados avaliados prospectivamente seja consequência dos altos níveis de ativação celular verificados nesses pacientes de co-infecção LV/HIV-1 (documento 1), assim como, do aumento da ativação no momento da reativação da doença (documento 2). Isso resultaria numa dinâmica contínua de proliferação, senescência e morte de linfócitos que carregam diferentes cadeias V $\beta$ , contribuindo para a ausência de um direcionamento da resposta. A reconstituição imunológica ineficiente e os níveis continuamente altos de células senescentes em T CD8<sup>+</sup> nesses pacientes podem contribuir para tal hipótese.

Apesar dos diferentes desfechos clínicos, as famílias V $\beta$  que dominaram o repertório desses cinco pacientes refletiram, conforme verificado no estudo transversal, as cadeias mais utilizadas pelos casos de mono-infecção com HIV-1 ou LV. Esse foi o caso de V $\beta$ 1 e V $\beta$ 13.2 que se destacaram nos casos de LV e V $\beta$ 3 e V $\beta$ 8 nos pacientes de HIV-1, os quais definiram o perfil oligoclonal em T CD8<sup>+</sup> em Pt2 e Pt3 na remissão clínica da LV. É interessante destacar que nos pacientes que apresentaram um episódio de reativação os percentuais de utilização de V $\beta$ 3 foram muito baixos, ao longo dos três momentos avaliados, especialmente em Pt4, reforçando a possibilidade da mobilização dessa família ser importante na infecção pelo HIV-1. Dessa maneira, o acompanhamento individual em conformidade ao que já tinha sido observado na avaliação transversal não mostrou a expressão diferencial de nenhuma família frente à condição de co-infecção LV/HIV-1.

A princípio, a visão otimista de que as poucas alterações no repertório V $\beta$  ao longo da evolução clínica dos pacientes coinfectados, com o aparecimento de novas famílias (oligoclonal) ou mesmo a participação de todas (policlonal), num ambiente de carga viral plasmática indetectável e pequenos aumentos nas contagens de células T CD4<sup>+</sup> (Pt2 e Pt3) não se concretizou (Cossarizza et al. 2004). Afinal, tais perfis também foram observados durante a reativação da LV. Assim, o perfil de distribuição V $\beta$  observado nos pacientes coinfectados deste estudo independe das contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e dos níveis de carga viral plasmática e, portanto, não pode ser associado a nenhum desfecho

clínico em especial. Além disso, a presença da TARV, bem como da profilaxia secundária em pacientes com perfis policlonais não impediram a reativação da LV.

A expressão de um segmento V $\alpha$  nesses linfócitos T, bem como, a diversidade da região CDR3 não foram avaliadas nesse estudo e, portanto só a análise do repertório V $\beta$  por citometria de fluxo não nos permite saber se um perfil oligo/policlonal está associado ou não a uma maior diversidade dos linfócitos T, com a presença de diferentes clones que reconhecem diferentes alvos dos antígenos em questão. Assim, as diferenças entre um perfil monoclonal após longo tempo de remissão clínica e um perfil policlonal associado à reativação da doença só serão entendidas mediante a análise da qualidade da resposta imune envolvida e, portanto, da natureza dos clones mobilizados.

O repertório V $\beta$  também foi avaliado *in vitro* após o estímulo com antígenos de *L. infantum* (Li) e da proteína p24 do HIV-1, no intuito de investigar se as células desses pacientes seriam capazes de responder aos estímulos e se isso ocorresse, quais seriam os V $\beta$  diferencialmente mobilizados. Resultados preliminares de apenas três pacientes apontaram que a grande maioria dos segmentos V $\beta$  foi igualmente expressa na presença ou ausência dos estímulos, principalmente na população de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, onde no total, seis famílias se expandiram e outras seis reduziram frente ao poço não estimulado (BG) nos três pacientes. Esses resultados podem refletir os níveis elevados de células senescentes nessa subpopulação, cuja capacidade proliferativa está comprometida. Embora, os níveis de apoptose não foram avaliados nesse estudo, acreditamos que as reduções observadas em relação ao BG podem ser consequência da estimulação antigênica crônica, bem como dos níveis altos de ativação celular que deixam as células mais suscetíveis à morte. Na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, oito segmentos V $\beta$  foram mobilizados no total frente aos estímulos, enquanto apenas dois tiveram sua utilização reduzida quando comparado ao BG. As poucas expansões indicam que algumas células ainda são capazes de proliferar e provavelmente são CD57<sup>-</sup> (Palmer et al. 2005).

É importante mencionar que apesar dos resultados serem provenientes de apenas três indivíduos acompanhados prospectivamente, os segmentos V $\beta$  envolvidos no repertório *in vitro* foram os mesmos cuja mobilização já tinha sido observada no repertório dos linfócitos T circulantes, seja na avaliação transversal ou na individual. Além disso, não foi observada a expansão de uma única família em comum nos três pacientes na mesma subpopulação de linfócitos T. Entretanto, V $\beta$ 5.1 se destacou em Pt1 e Pt12 frente ao Ag-Li no repertório de T CD4<sup>+</sup> antes e após o tratamento e no grupo de indivíduos saudáveis. Apesar



dessa expansão em comum, os percentuais de utilização não foram significativamente diferentes entre esses dois grupos. O segmento V $\beta$ 13.2 em T CD4<sup>+</sup> cuja mobilização também foi observada *ex vivo* nos pacientes monoinfectados para LV na fase ativa e posteriormente, nos coinfectados ativos também se expandiu *in vitro* em Pt3 e Pt12. A ausência de expansão de V $\beta$ 13.2 nos sadios aponta para a possibilidade desta família participar da resposta imune frente a esse parasito. Os experimentos *in vitro* com CMSP de pacientes monoinfectados com LV já estão em curso e poderão esclarecer a importância desta família frente à *L.infantum*. Por fim, confirmando dados anteriores da análise do repertório dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> circulantes, o percentual de células utilizando a cadeia V $\beta$ 3 se expandiu frente ao p24 em Pt1 e Pt12, mas não apresentou expansão nas células dos indivíduos sadios. Recentemente, a expansão desse mesma família *in vitro* frente ao p24 no grupo de pacientes monoinfectados pelo HIV-1 sugere fortemente a participação de V $\beta$ 3 na resposta a este antígeno (dados não mostrados).

Dessa maneira, o notável comprometimento imunológico desses pacientes coinfectados na fase ativa da LV, a despeito da TARV e do tratamento para *Leishmania*, pode ser implicado na dinâmica de utilização das famílias V $\beta$ , onde algumas tenderam a se expandir, ao mesmo tempo, em que outras apresentaram percentuais reduzidos. A predominância do perfil policlonal para os dois antígenos após o tratamento novamente indicam uma ausência do direcionamento de uma resposta, que pode ser visto positivamente por um lado, ou negativamente por outro, conforme discutido acima para os cinco pacientes do acompanhamento prospectivo.

Em conclusão, o repertório de células T observado nos pacientes LV/HIV-1 está alterado e é resultante das consequências da patogênese do vírus e do parasito, que impõem intensa depleção de células T CD4<sup>+</sup>, ineficiente reconstituição imunológica, níveis potencializados de ativação celular, morte celular induzida por ativação, exaustão clonal, alteração no *output* tímico ou mesmo expansões de células pré-existentes dirigidas contra os peptídeos apresentados.

O contínuo *output* tímico é a única maneira de se equilibrar esse processo totalmente desregulado da homeostase imune mediante a intensa ativação celular, diferenciação/senescência e exaustão de clones respondedores e não-respondedores e comprometimento do repertório V $\beta$ . No entanto, os recursos imunes são limitados e a capacidade regenerativa a partir do *pool* de células progenitoras também pode sofrer exaustão com o tempo e a idade, sendo ainda mais exacerbada em indivíduos

concomitantemente infectados pelo HIV-1. A capacidade de renovação das células T pelo timo através da quantificação dos níveis de TRECS nas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> periféricas poderá esclarecer se o maior grau de comprometimento imune na coinfeção LV/HIV-1 está relacionado a um menor *output* tímico, já que a LV também compromete a medula óssea. Aliado a isso, a posterior avaliação da resposta imune específica esclarecerá as principais diferenças entre esses pacientes coinfectados ao longo da evolução clínica da LV, no que se refere à capacidade deles alcançarem a remissão clínica, ao contrário daqueles que reativam a doença. Por fim, poderemos inferir se os níveis de células TREC<sup>+</sup> se correlacionam com as perturbações do repertório TCRVβ *ex vivo* e *in vitro*.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ A infecção por *Leishmania* é um importante cofator para o aumento do grau de ativação do sistema imune em indivíduos concomitantemente infectados pelo HIV-1, especialmente naqueles com a forma visceral da doença (LV/HIV-1).
- ✓ Os pacientes coinfectados LV/HIV-1 apresentaram diferenças relevantes em relação aos pacientes com a forma tegumentar (LTA/HIV-1) e aos casos de HIV-1 apenas, principalmente no que se refere ao comprometimento imune e ao grau de ativação celular, independentemente da carga viral plasmática e do tratamento anti-*Leishmania*. Tais diferenças podem ser devido às características intrínsecas da LV capazes de amplificar a imunossupressão/ativação conferida pelo HIV-1.
- ✓ Os altos níveis de LPS na LV se correlacionaram positivamente com a ativação de células T, citocinas pró-inflamatórias e MIF, apontando que este produto bacteriano não associado à infecção por *Leishmania* e, de provável origem luminal, deve contribuir para o prejuízo da função imune efetora, exercendo um papel importante da imunopatogênese da LV. Tal molécula também está associada aos altos níveis ativação celular observados nos pacientes LV/HIV-1.
- ✓ O LPS plasmático ao lado das consequências imunopatogênicas da infecção por *Leishmania infantum* foram cofatores importantes para a potencialização dos níveis de ativação celular em pacientes LV/HIV-1. Tal fato ocorre provavelmente através do incremento do *status* pró-inflamatório e não pelo aumento da carga parasitária,

uma vez que o número de parasitos detectados no sangue diminuiu após o tratamento.

- ✓ Os altos percentuais de linfócitos T circulantes senescentes/diferenciados revelaram a ocorrência do fenômeno da imunosenescência na coinfeção LV/HIV-1. Apesar de não diferir dos casos de HIV-1, a permanência desses níveis de senescência refletiu o intenso processo de ativação celular, o que pode agravar o mecanismo imunopatogênico de depleção de células T CD4<sup>+</sup>.
- ✓ Apesar das famílias V $\beta$  mais utilizadas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos pacientes coinfectados refletirem exatamente o que ocorreu na LV e no HIV-1 separadamente, o TCRV $\beta$  em T CD8<sup>+</sup> apresentou-se diferente e bastante perturbado. Tal perfil alterado, com ausência de uma família V $\beta$  mobilizada diferencialmente frente à coinfeção LV/HIV-1, pode estar diretamente relacionado ao comprometimento imunológico e ao grau de ativação celular potencializado nesta associação.
- ✓ O acompanhamento individual dos pacientes coinfectados mostrou que o desfecho clínico da LV (remissão clínica ou reativação) não foi associado à presença de um determinado perfil de distribuição das famílias V $\beta$  (mono/oligo/policlonal). Além disso, tais perfis foram independentes da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e da carga viral plasmática.
- ✓ Os resultados dos estudos transversais estão sendo reproduzidos nos pacientes coinfectados acompanhados prospectivamente, os quais também mostraram que a recuperação imune é ineficiente, apesar do controle da carga viral plasmática e da terapia anti-*Leishmania* e que a presença de ambos não é capaz de evitar as reativações. Além disso, a intensa imunossupressão pode contribuir para a disseminação da doença e o aparecimento de lesões cutâneas concomitantes.

## 8. PERSPECTIVAS

Acreditamos que este trabalho tenha contribuído para conhecermos um pouco mais sobre a dinâmica de interação entre a infecção pelo HIV-1 e pela *Leishmania infantum* *in vivo* e sobre as consequências diretas dessa interface no grau de comprometimento imunológico dos pacientes acometidos. Além disso, também tentamos compreender algumas questões ainda bastante discutidas na literatura sobre a imunopatogênese da leishmaniose visceral. No entanto, inúmeras perguntas ainda permanecem e experimentos em andamento priorizando a casuística de pacientes coinfectados recrutados e acompanhados prospectivamente consistem em:

- ✓ Finalizar as análises de senescência replicativa e dos níveis de LPS plasmáticos ao longo do acompanhamento clínico dos pacientes coinfectados, bem como, avaliar o percentual de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> ativadas através da coexpressão de CD38 e HLA-DR. Tais resultados esclarecerão o relacionamento entre esses três parâmetros e o papel dessas moléculas associadas à ativação no acompanhamento de pacientes coinfectados com diferentes desfechos clínicos.
- ✓ Avaliar se o uso de profilaxia secundária influencia na supressão da carga parasitária circulante e em uma diminuição da ativação celular e nas frequentes reativações da LV.
- ✓ Avaliar a resposta imune específica frente aos antígenos parasitários e virais, no intuito de entender os efeitos da persistente ativação do sistema imune e da imunosenescência sobre a qualidade da resposta efetora, bem como, possíveis diferenças funcionais entre a remissão clínica e a reativação da LV.
- ✓ Avaliar a capacidade de renovação de células T pelo timo (*output* tímico) através da quantificação dos níveis de TRECS nas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> periféricas desses pacientes para um maior esclarecimento sobre as principais diferenças entre esses pacientes coinfectados ao longo da evolução clínica da LV, no que se refere à reconstituição imunológica ineficiente, persistência do grau de senescência e perturbações do repertório TCRV $\beta$  *ex vivo* e *in vitro*.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Alexandrino-de-Oliveira P, Santos-Oliveira JR, Dorval ME, Da-Costa FC, Pereira GR, da Cunha RV, Paniago AM, Da-Cruz AM 2010. HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 692-697.

Akolkar PN, Gulwani-Akolkar B, Pergolizzi R, Bigler RD, Silver J 1993. Influence of HLA genes on T cell receptor V segment frequencies and expression levels in peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 150: 2761-2773.

Allen CD, Okada T, Cyster JG 2007. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27: 190-202

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21: 334-359.

Alvar J, Vélez I, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, the WHO Leishmaniasis control team 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* 7: e35671.

Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LM, Barral A, Barral-Netto M 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J* 13: 9-13.

Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, Kim EY, Autissier P, Wurcel A, Zaman T, Stone D, Mefford M, Morgello S, Singer EJ, Wolinsky SM, Gabuzda D 2008. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS One* 3:e2516.

Anthony KB, Yoder C, Metcalf JA, DerSimonian R, Orenstein JM, Stevens RA, Falloon J, Polis MA, Lane HC, Sereti I 2003. Incomplete CD4 T cell recovery in HIV-1 infection after 12 months of highly active antiretroviral therapy is associated with ongoing increased CD4 T cell activation and turnover. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33: 125-33.

Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, Orlando G, Gramiccia M, Acquaviva V, Foschi A, Corvasce S, Colomba C, Titone L, Parravicini C, Cascio A,

Corbellino M 2007. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. *Clin Infect Dis* 44: 1602-10.

Appay V, Almeida JR, Sauce D, Autran B, Papagno L 2007. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. *Exp Gerontol* 42: 432-437.

Appay V, Rowland-Jones SL 2002. Premature ageing of the immune system: the cause of AIDS? *Trends Immunol* 23: 580-585.

Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL 2002. Memory CD8<sup>+</sup> T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8: 379-385.

Appay V, Sauce D 2008. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* 214: 231-241.

Atta AM, Colossi R, Sousa-Atta ML, Jeronimo SM, Nascimento MD, Bezerra GF, Orge G, Carvalho EM 2004. Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 525-530.

Autran B, Carcelain G, Li Ts, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debré P, Leibowitch J 1997. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4<sup>+</sup> T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 277: 112-116.

Baba CS, Makharia GK, Mathur P, Ray R, Gupta SD, Samantaray JC. Chronic diarrhea and malabsorption caused by *Leishmania donovani* 2006. *Indian J Gastroenterol* 25: 309-310.

Bacellar O, D'oliveira A Jr, Jerônimo S, Carvalho EM 2000. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* 12: 1228-1231.

Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R 1996. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7849-7854.

- Balkhair A, Ben Abid F 2008. Gastric and cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis in a patient with advanced HIV. *Int J Infect Dis* 12: 111-113.
- Barral-Netto M, Badaró R, Pedral-Sampaio D, Carvalho EM, Falcoff R 1991. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 163: 853-857.
- Barreto de Souza V, Pacheco GJ, Silva AR, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Saraiva EM, Bou-Habbib DC 2006. Increased *Leishmania* replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *J Infect Dis* 194: 846-854.
- Benito JM, Zabay JM, Gil J, Bermejo M, Escudero A, Sanchez E, Fernandez-Cruz E 1997. 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* 14: 128-135.
- Benito JM, Lopez M, Lozano S, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. CD38 expression on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy 2004. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 227-233.
- Benito JM, López M, Soriano V 2004. The role of CD8<sup>+</sup> T-cell response in HIV infection. *AIDS Rev* 6: 79-88.
- Bentwich Z, Kalinkovich A, Weisman Z 1995. Immune activation is a dominant factor in the pathogenesis of African AIDS. *Immunol Today* 16: 187-191.
- Bentwich Z, Weisman Z, Moroz C, Bar-Yehuda S, Kalinkovich A 1996. Immune dysregulation in Ethiopian immigrants in Israel: relevance to helminth infections? *Clin Exp Immunol* 103: 239-243.
- Bernier R, Barbeau B, Tremblay MJ, Olivier M 1998. The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor-kB elements. *J Immunol* 160: 2881-2888.
- Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, Roederer M, Koup RA 2006. HIV nonprogressors

preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 107: 4781-4789.

Bofill M, Martinez-Picado J, Ruiz-Hernandez R, Cabrera C, Marfil S, Erkizia I, et al 2006. Naive CD4<sup>(+)</sup> T cells and recent thymic emigrant levels in treated individuals with HIV: clinical relevance. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22: 89389-6.

Boldt-Houle DM, Rinaldo CR Jr, Ehrlich GD 1993. Random depletion of T cells that bear specific T cell receptor V beta sequences in AIDS patients. *J Leukoc Biol* 54: 486-491.

Bonilla FA, Oettgen HC 2010. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125: S33-40.

Bozza FA, Gomes RN, Japiassú AM, Soares M, Castro-Faria-Neto HC, et al 2004. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock* 22: 309-313.

Bozza MT, Martins YC, Carneiro LA, Paiva CN 2012. Macrophage migration inhibitory factor in protozoan infections. *J Parasitol Res* 2012: 1-12.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV – Brasília, 2011.

Brasil, Ministério da Saúde, MS/PN-DST e AIDS. Boletim Epidemiológico de AIDS, 01º a 26º semanas epidemiológicas, janeiro a junho de 2011. Acesso em abril de 2012. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>.

Brasil, Ministério da Saúde. Sistema de Vigilância em Saúde. Acesso em abril de 2012. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv\\_casos\\_05\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf), 2012.

Brenchley JM, Douek DC 2008. HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol* 1: 23-30.

Brenchley JM, Douek DC 2012. Microbial translocation across the GI tract. *Annu Rev Immunol* 30: 149-173.

Brenchley JM, Price DA, Douek D 2006a. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* 7: 235-239.



Brenchley JM, 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 2006b. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12: 1365-1371.

Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Haase AT, Douek DC 2004. CD4<sup>+</sup> T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 749-759.

Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA 2003. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 101: 2711-2720.

Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, Asher TE, Scheinberg P, Price DA, Hage CA, Kholi LM, Khoruts A, Frank I, Else J, Schacker T, Silvestri G, Douek DC 2008. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* 112: 2826-2835.

Cacopardo B, Nigro L, Preiser W, Fama A, Satariano MI, Braner J, Celesia BM, Weber B, Russo R, Doerr HW 1996. Prolonged Th2 cell activation and increased viral replication in HIV-*Leishmania* co-infected patients despite treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 434-435.

Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R 1994. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 179: 1895-1902.

Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, et al 2000. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* 6: 164-170.

Calandra T, Roger T 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 791-800.

Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R 1998. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11383-11388.

- Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, Brodskyn C, Costa J, Barral-Netto M, Barral A 2005. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis* 5: 113.
- Caradonna L, Amati L, Magrone T, Pellegrino NM, Jirillo E, Caccavo D 2000. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res* 6: 205-214.
- Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaró R, Johnson WD Jr 1989. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest* 83: 860-864.
- Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG 1994. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 152: 5949-5956.
- Carvalho EM, Badaró R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD Jr 1985. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 76: 2066-2069.
- Casado JL, Lopez-Velez R, Pintado V, Quereda C, Antela A, Moreno S 2001. Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 202-205.
- Castermans E, Hannon M, Dutrieux J, Humblet-Baron S, Seidel L, Cheynier R, et al 2011. Thymic recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation with non-myeloablative conditioning is limited to patients younger than 60 years of age. *Haematologica* 96: 298-306.
- Cenini P, Berhe N, Hailu A, McGinnes K, Frommel D 1993. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. *J Infect Dis* 168: 986-993.
- Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, Appay V, Rizzardi GP, Fleury S, Lipp M, Förster R, Rowland-Jones S, Sékaly RP, McMichael AJ, Pantaleo G 2001. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410: 106-111.

Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, Roederer M, De Rosa SC 2009. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol* 85: 88-97.

Chavan S, Bennuri B, Kharbanda M, Chandrasekaran A, Bakshi S, Pahwa S 2001. Evaluation of T cell receptor gene rearrangement excision circles after antiretroviral therapy in children infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 183: 1445-1454.

Chavale H, Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM, Enosse S 2012. Enhanced T cell activation is observed in falciparum malaria associated HIV-1/AIDS patients from Mozambique. *Mem Inst Osw Cruz* :

Clarêncio J, de Oliveira CI, Bomfim G, Pompeu MM, Teixeira MJ, Barbosa TC, Souza-Neto S, Carvalho EM, Brodskyn C, Barral A, Barral-Netto M 2006. Characterization of the T-cell receptor Vbeta repertoire in the human immune response against *Leishmania* parasites. *Infect Immun* 74: 4757-4765.

Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB 2006. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J* 5: 85.

Connolly NC, Riddler SA, Rinaldo CR 2005. Proinflammatory cytokines in HIV disease-a review and rationale for new therapeutic approaches. *AIDS Rev* 7: 168-180.

Connors M, Kovacs JA, Krevat S, Gea-Banacloche JC, Sneller MC, Flanigan M, Metcalf JA, Walker RE, Falloon J, Baseler M, Feuerstein I, Masur H, Lane HC 1997. HIV infection induces changes in CD4<sup>+</sup> T-cell phenotype and depletions within the CD4<sup>+</sup> T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies. *Nat Med* 3: 533-540.

Cooke KR, Olkiewicz K, Erickson N, Ferrara JL 2002. The role of endotoxin and the innate immune response in the pathophysiology of acute graft versus host disease. *J Endotoxin Res* 8: 441-448.

Corbeau P, Reynes J 2011. Immune reconstitution under antiretroviral therapy: the new challenge in HIV-1 infection. *Blood* 117: 5582-5590.

- Cota GF, de Sousa MR, Rabello A 2011. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1153.
- Costa CH 2008. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saúde Pública* 24: 2959-2963.
- Costa CH, Werneck GL, Lamounier D, Holanda TA, Aguiar GB, et al 2010. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? – a case control study. *Rev Soc Bras Med Tropical* 43: 386-395.
- Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL 2003. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol* 40: 677-684.
- Costa FA, Guerra JL, Silva SM, Klein RP, Mendonça IL, Goto H 2000. CD4(+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 33: 1455-1458.
- Cossarizza A, Ortolani C, Mussini C, Guaraldi G, Mongiardo N, Borghi V, Barbieri D, Bellesia E, Franceschini MG, De Rienzo B, et al 1995. Lack of selective V beta deletion in CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and functional integrity of T-cell repertoire during acute HIV syndrome. *AIDS* 9: 547-553.
- Cui W, Kaech SM 2010. Generation of effector CD8<sup>+</sup> T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev* 236: 151-166.
- Da-Cruz AM, Machado ES, Menezes JA, Rutowitsch MS, Coutinho SG 1992. Cellular and humoral immune responses of a patient with American cutaneous leishmaniasis and AIDS. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 511-512.
- Da-Cruz AM, Rodrigues AC, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Sabbaga-Amato V, Posada MP, Lindoso JA, Goto H 2006. Alterações imunopatológicas na co-infecção HIV-Leishmania. *Rev Soc Bras Med Trop* 39 Suppl 3: 75-79.
- Coura JR, Galvão-Castro B, Grimaldi G 1987. Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 581-582.

da Matta VL, Hoshino-Shimizu S, Dietze R, Corbett CE 2000. Detection of specific antibody isotypes and subtypes before and after treatment of American visceral leishmaniasis. *J Clin Lab Anal* 14: 5-12.

D'Amico R, Yang Y, Mildvan D, Evans SR, Schnizlein-Bick CT, Hafner R, Webb N, Basar M, Zackin R, Jacobson MA 2005. Lower CD4<sup>+</sup> T lymphocyte nadirs may indicate limited immune reconstitution in HIV-1 infected individuals on potent antiretroviral therapy: analysis of immunophenotypic marker results of AACTG 5067. *J Clin Immunol* 25: 106-115.

Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ, Walker BD 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443: 350-354.

de Almeida AS, Medronho Rde A, Werneck GL 2011. Identification of risk areas for visceral leishmaniasis in Teresina, Piaui State, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 84: 681-687.

De la Loma, Alvar J, Martinez-Galiano E, Blázquez J, Alcalá-Muñoz A, Nájera R 1985. Leishmaniasis or AIDS? *Trans R Soc Trop Méd Hyg* 79: 421-422.

Del Giudice P, Mary-Krause M, Pradier C, Grabar S, Dellamonica P, Marty P, Gastaut JA, Costagliola D, Rosenthal E, and the clinical Group of the French Hospital Database on HIV 2002. 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* 186: 1366-1370.

Doisne JM, Urrutia A, Lacabaratz-Porret C, Goujard C, Meyer L, Chaix ML, Sinet M, Venet A 2004. CD8<sup>+</sup> T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J Immunol* 173: 2410-2418.

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 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4 T cells. *Nature* 417: 95-98.

- Douek DC, Roederer M, Koup RA 2009. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med* 60: 471-484.
- Douek DC, Koup RA 2000. Evidence for thymic function in the elderly. *Vaccine* 18: 1638-1641.
- Douek DC, Koup RA, McFarland RD, Sullivan JL, Luzuriaga K 2000. Effect of HIV on thymic function before and after antiretroviral therapy in children. *J Infect Dis* 181: 1479-1482.
- Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396: 690-695.
- Duarte MI, da Matta VL, Corbett CE, Laurenti MD, Chebabo R, Goto H 1989. Interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 73-76.
- Dutra M, Martinelli R, de Carvalho EM, Rodrigues LE, Brito E, Rocha H 1985. Renal involvement in visceral leishmaniasis. *Am J Kidney Dis* 6: 22-27.
- Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, Kityo C, Mugenyi P, Cao H 2005. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol* 174: 4407-4414.
- El Hag IA, Hashim FA, el Toum IA, Homeida M, el Kalifa M, el Hassan AM 1994. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). *J Clin Pathol* 47: 547-551.
- Estes J, Baker JV, Brechley JM, Khoruts A, Barthold JL, Bantle A, Reilly CS, Beilman GJ, George ME, Douek DC, Haase AT, Schacker TW 2008. Collagen deposition limits immune reconstitution in the gut. *J Infect Dis* 198: 456-464.
- Estes JD, Harris LD, Klatt NR, Tabb B, Pittaluga S, Paiardini M, Barclay GR, Smedley J, Pung R, Oliveira KM, , Silvestri G, Douek DC, Miller CJ, Haase AT, Lifson J, Brechley JM 2010. Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathog* 6: e1001052.
- Evans TG, Kallas EG, Luque AE, Menegus M, McNair C, Looney RJ 1999. Expansion of the CD57 subset of CD8 T cells in HIV-1 infection is related to CMV serostatus. *AIDS* 13: 1139-1141.

Fahey JL 1998. Cytokines, plasma immune activation markers, a clinically relevant surrogate markers in human immunodeficiency virus infection. *Clin Diag Lab Immunol* 5: 597-603.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-877.

Ferraz, R 2010. Apoptose e perfil do repertório da cadeia variável beta do receptor de células T em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes com leishmaniose cutânea. Dissertação de mestrado.

Focosi D, Bestagno M, Burrone O, Petrini M 2010. CD57<sup>+</sup> T lymphocytes and functional immune deficiency. *J Leukoc Biol* 87:107-16.

Fry DE 2012. Sepsis, systemic inflammatory response, and multiple organ dysfunction: the mystery continues. *Am Surg* 78:1-8.

Galvão-Castro B, Sá Ferreira JA, Marzochi KF, Marzochi MC, Coutinho SG, Lambert PH 1984. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 56: 58-66.

Garg R, Barat C, Ouellet M, Lodge R, Tremblay MJ 2009. 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* 3:e441.

Gea-Banacloche JC, Clifford Lane H 1999. Immune reconstitution in HIV infection. *AIDS* 13 Suppl A: S25-38.

George MD, Reay E, Sankaran S, Dandekar S 2005. Early antiretroviral therapy for simian immunodeficiency virus infection leads to mucosal CD4<sup>+</sup> T-cell restoration and enhanced gene expression regulating mucosal repair and regeneration. *J Virol* 79: 2709-2719.

Giacoaia-Gripp CBW, Neves Jr. I, Galhardo MC, Morgado MG 2005. Flow Cytometry evaluation of the T-cell receptor V $\beta$  repertorie among HIV-1 infected individuals before and after antiretroviral therapy. *J Clin Immunol* 25: 116-126.

Giacoaia-Gripp CB, Sales AM, Nery JA, Santos-Oliveira JR, de Oliveira AL, Sarno EN, Morgado MG 2011. Evaluation of cellular phenotypes implicated in immunopathogenesis

and monitoring immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV/leprosy cases. *PLoS One* 6: e28735.

Gioannini TL, Weiss JP 2007. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol Res* 39: 249-260.

Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, Detels R 1999. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 179: 859-870.

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 2002. Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29: 346-355.

Giovannetti A, Pierdominici M, Marziali M, Mazzetta F, Caprini E, Russo G, Bugarini R, Bernardi ML, Mezzaroma I, Aiuti F 2003. Persistently biased T-cell receptor repertoires in HIV-1-infected combination antiretroviral therapy-treated patients despite sustained suppression of viral replication. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34: 140-154.

Goicoechea M, Smith DM, Liu L, May S, Tenorio AR, Ignacio CC, Landay A, Haubrich R 2006. Determinants of CD4<sup>+</sup> T cell recovery during suppressive antiretroviral therapy: association of immune activation, T cell maturation markers, and cellular HIV-1 DNA. *J Infect Dis* 194: 29-37.

Gómez Senent S, Adan Merino L, Mora Sanz P 2009. Kala azar with gastric involvement. *Gastroenterol Hepatol* 32: 176-177.

Gordon S, Klatt N, Bosinger S, et al 2007. Severe depletion of mucosal CD4<sup>+</sup> T cells in AIDS-free simian immunodeficiency virus–infected sooty mangabeys. *J. Immunol* 179: 3026–3034.

Gorochov G, Neumann AU, Kereveur A, Parizot C, Li T, Katlama C, Karmochkine M, Raguin G, Autran B, Debré P 1998. Perturbation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4<sup>+</sup> repertoire during antiviral therapy. *Nature Med* 4: 215-221.



- Goto H, Lindoso JA 2004. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 37: 615-623.
- Goto H, Prianti MG 2009. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51: 241-246.
- Grimaldi Jr G, Tesh RB, McMahon-Pratt D 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 41: 687-725.
- Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ 2006. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 12: 289-295.
- Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE 2002. CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* 8: 319-323.
- Grunewald J, Janson CH, Wigzell H 1991. Biased expression of individual T cell receptor V gene segments in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> human peripheral blood T lymphocytes. *Eur J Immunol* 21: 819-822.
- Gudo ES, Bhatt NB, Bila DR, Abreu CM, Tanuri A, Savino W, Silva-Barbosa SD, Jani IV 2009. Co-infection by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): does immune activation lead to a faster progression to AIDS? *BMC Infect Dis* 9: 211.
- Haas DW, Geraghty DE, Andersen J, Mar J, Moutsinger AA, D'Aquila RT, Unutmaz D, Benson CA, Ritchie MD, Landay A; AIDS Clinical Trials Group 2006. Immunogenetics of CD4 lymphocyte count recovery during antiretroviral therapy: An AIDS Clinical Trials Group study. *J Infect Dis* 194: 1098-1107.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH 2011. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol* 27: 403-409.
- Harrison OJ, Maloy KJ 2011. Innate immune activation in intestinal homeostasis. *J Innate Immun* 3: 585-593.
- Hatzakis A, Touloumi G, Karanickolas R, Karafoulidou A, Mandalaki T, Anastassopoulou C, et al 2000. Effect of recent thymic emigrants on progression of HIV-1 disease. *Lancet* 355: 599-604.

Havlir DV, Strain MC, Clerici M, Ignacio C, Trabattoni D, Ferrante P, Wong JK 2003. Productive infection maintains a dynamic steady state of residual viremia in human immunodeficiency virus type 1-infected persons treated with suppressive antiretroviral therapy for five years. *J Virol* 77: 11212-11219

Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JW, Verschuren MC, Borleffs JC, Boucher CA, et al 2000. Increased cell division but not thymic output dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naïve T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med* 6: 1036-4102.

Hodara VL, Jeddi-Tehrani M, Grunewald J, Andersson R, Scarlatti G, Esin S, Holmberg V, Libonatti O, Wigzell H 1993. HIV infection leads to differential expression of T-cell receptor V beta genes in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *AIDS* 7: 633-638.

Hodes RJ, Hathcock KS, Weng NP 2002. Telomeres in T and B cells. *Nat Rev Immunol* 2: 699-706.

Homann D, Teyton L, Oldstone MB 2001. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8<sup>+</sup> but declining CD4<sup>+</sup> T-cell memory. *Nat Med* 7: 913-919.

Hunt PW, Deeks SG, Rodriguez B, Valdez H, Shade SB, Abrams DI, Kitahata MM, Krone M, Neilands TB, Brand RJ, Lederman MM, Martin JN 2003. Continued CD4 cell count increases in HIV-infected adults experiencing 4 years of viral suppression on antiretroviral therapy. *AIDS* 17: 1907-1915.

Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, Landay A, Martin J, Sinclair E, Asher AI, Deeks SG, Douek DC, Brechley JM 2009. 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* 199: 1177-1185.

Kariminia A, Bourreau E, Ronet C, Couppie P, Sainte-Marie D, Tacchini-Cottier F, Launois P 2007. Selective expression of the V beta 14 T cell receptor on Leishmania guyanensis--specific CD8<sup>+</sup> T cells during human infection. *J Infect Dis* 195: 739-747.

Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 28: 573-621.

Kelley CF, Kitchen CM, Hunt PW, Rodriguez B, Hecht FM, Kitahata M, Crane HM, Willig J, Mugavero M, Saag M, Martin JN, Deeks SG 2009. Incomplete peripheral CD4<sup>+</sup> cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. *Clin Infect Dis* 48: 787-794.

Kimura N, Toyonaga B, Yoshikai Y, Du RP, Mak TW 1987. Sequences and repertoire of the human T cell receptor alpha and beta chain variable region genes in thymocytes. *Eur J Immunol* 17: 375-383.

Kotler DP, Gaetz HP, Lange M, Klein EB, Holt PR 1984. Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 101: 421-428.

Kotzin BL, Karuturi S, Chou YK, Lafferty J, Forrester JM, Better M, Nedwin GE, Offner H, Vandembark AA 1991. Preferential T-cell receptor beta-chain variable gene use in myelin basic protein-reactive T-cell clones from patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9161-9165.

Kou ZC, Puhr JS, Wu SS, Goodenow MM, Sleasman JW 2003. Combination antiretroviral therapy results in a rapid increase in T cell receptor variable region beta repertoire diversity within CD45RA CD8 T cells in human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis* 187: 385-397.

Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 68: 4650-4655.

Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schönian G 2011. Comparative microsatellite typing of new world leishmania infantum reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1155.

Lange CG, Valdez H, Medvik K, Asaad R, Lederman MM 2002. CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte nadir and the effect of highly active antiretroviral therapy on phenotypic and functional immune restoration in HIV-1 infection. *Clin Immunol* 102: 154-161.

Launois P, Maillard I, Pingel S, Swihart KG, Xénarios I, Acha-Orbea H, Diggelmann H, Locksley RM, MacDonald HR, Louis JA 1997. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha

8 CD4<sup>+</sup> T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* 6: 541-549.

Lawn SD, Butera ST, Folks TM 2001. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev* 14: 753-777.

Le RQ, Melenhorst JJ, Battiwalla M, Hill B, Memon S, Savani BN, et al 2011. Evolution of the donor T cell repertoire in recipients in the second decade after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 117: 5250-5256

Lederman HM, Williams PL, Wu JW, Evans TG, Cohn SE, McCutchan JA, Koletar SL, Hafner R, Connick E, Valentine FT, McElrath MJ, Roberts NJ Jr, Currier JS; AIDS Clinical Trials Group 889 Study Team 2003. Incomplete immune reconstitution after initiation of highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-infected patients with severe CD4<sup>+</sup> cell depletion. *J Infect Dis* 188: 1794-1803.

Lee PI, Ciccone EJ, Read SW, Asher A, Pitts R, Douek DC, Brenchley JM, Sereti I 2009. Evidence for translocation of microbial products in patients with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *J Infect Dis* 199: 1664-1670.

Li Q, Estes JD, Duan L, Jessurun J, Pambuccian S, Forster C, Wietgreffe S, Zupancic M, Schacker T, Reilly C, Carlis JV, Haase AT 2008. Simian immunodeficiency virus-induced intestinal cell apoptosis is the underlying mechanism of the regenerative enteropathy of early infection. *J Infect Dis* 197: 420-429.

Li TS, Tubiana R, Katlama C, Calvez V, Ait Mohand H, Autran B 1998. Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet* 351: 1682-1686.

Lieberman JM, Sacchettini J, Marks C, Marks WH 1997. Human intestinal fatty acid binding protein: report of an assay with studies in normal volunteers and intestinal ischemia. *Surgery* 121: 335-342.

Lichterfeld M, Mou D, Cung TD, Williams KL, Waring MT, Huang J, Pereyra F, Trocha A, Freeman GJ, Rosenberg ES, Walker BD, Yu XG 2008. Telomerase activity of HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells: constitutive up-regulation in controllers and selective increase by blockade of PD ligand 1 in progressors. *Blood* 112: 3679-3687.

- Liu G, Zhang L, Zhao Y 2010. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clin Exp Immunol* 160: 168-175.
- Lopez-Velez R, Casado J, Pintado V 2001. Decline of a visceral leishmaniasis epidemic in HIV-infected patients after the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Clin Microbiol Infect* 7: 394-395.
- Luz KG, Tuon FF, Duarte MI, Maia GM, Matos P, Ramos AM, Nicodemo AC 2010. Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 393-395.
- Maidana-Giret MT, Silva TM, Sauer MM, Tomiyama H, Levi JE, Bassichetto KC, Nishiya A, Diaz RS, Sabino EC, Palacios R, Kallas EG 2009. GB virus type C infection modulates T-cell activation independently of HIV-1 viral load. *AIDS* 23: 2277-2287.
- Mak TW, Caccia N, Reis M, Ohashi P, Sangster R, Kimura N, Toyonaga B 1987. Genes encoding the alpha, beta, and gamma chains of the human T cell antigen receptor. *J Infect Dis* 155: 418-422.
- Malhotra U, Huntsberry C, Holte S, Lee J, Corey L, McElrath MJ 2006. CD4<sup>+</sup> T cell receptor repertoire perturbations in HIV-1 infection: association with plasma viremia and disease progression. *Clin Immunol* 119: 95-102.
- Malhotra U, Spielman R, Concannon P 1992. Variability in T cell receptor V beta gene usage in human peripheral blood lymphocytes. Studies of identical twins, siblings, and insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Immunol* 149: 1802-1808.
- Martin-Blondel G, Mars LT, Liblau RS 2012. Pathogenesis of the immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-infected patients. *Curr Opin Infect Dis* 25: 312-320.
- Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M 2005. Massive infection and loss of memory CD4<sup>+</sup> T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434: 1093-1097.
- McCune JM 2001. The dynamics of CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 410: 974-979.

- Medrano FJ, Rey C, Leal M, Cañavate C, Rubio A, Sánchez-Quijano A, Alvar J, Lissen E 1998. Dynamics of serum cytokines in patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection. *Clin Exp Immunol* 114: 403-407.
- Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, Boden D, Racz P, Markowitz M 2004. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 761-770.
- Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Jean-Pierre P, Manuelli V, Lopez P, Shet A, Low A, Mohri H, Boden D, Racz P, Markowitz M 2006. Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS Med* 3: e484.
- Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 166: 1912-1920.
- Melenhorst JJ, Eniafe R, Follmann D, Nakamura R, Kirby M, Barrett AJ 2002. Molecular and flow cytometric characterization of the CD4 and CD8 T-cell repertoire in patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 119: 97-105.
- Mellors JW, Griffith BP, Ortiz MA, Landry ML, Ryan JL 1991. Tumor necrosis factor alpha/cachectin enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages. *J Infect Dis* 163: 78-82.
- Meuer SC, Cooper DA, Hodgdon JC, Hussey RE, Fitzgerald KA, Schlossman SF, Reinherz EL 1983. Identification of the receptor for antigen and major histocompatibility complex on human inducer T lymphocytes. *Science* 222: 1239-1242.
- Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan CW, Van Baarle D, Kostense S, Miedema F, McLaughlin M, Ehler L, Metcalf J, Liu S, Connors M 2002. HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* 3: 1061-1068
- Miller V, Mocroft A, Reiss P, Katlama C, Papadopoulos AI, Katzenstein T, Lunzen J, Antunes F, Phillips AN, Lundgren JD 1999. Relations among CD4 lymphocyte count

nadir, antiretroviral therapy, and HIV-1 disease progression: results from the EuroSIDA Study. *Ann Intern Med* 130: 570-577.

Miller SI, Ernst RK, Bader MW 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 3: 36-46.

Moebius U, Manns M, Hess G, Kober G, Meyer zum Büschenfelde KH, Meuer SC 1990. T cell receptor gene rearrangements of T lymphocytes infiltrating the liver in chronic active hepatitis B and primary biliary cirrhosis (PBC): oligoclonality of PBC-derived T cell clones. *Eur J Immunol* 20: 889-896.

Mogensen TH 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22: 240-273.

Mojumdar K, Vajpayee M, Chauhan NK, Singh A, Singh R, Kurapati S 2012. Altered T cell differentiation associated with loss of CD27 and CD28 in HIV infected Indian individuals. *Cytometry B Clin Cytom* 82: 43-53.

Muigai R, Gatei DG, Shaunak S, Wozniak A, Bryceson AD 1983. Jejunal function and pathology in visceral Leishmaniasis. *Lancet* 2: 476-479.

Nascimento ET, Moura ML, Queiroz JW, Barroso AW, Araujo AF, Rego EF, Wilson ME, Pearson RD, Jeronimo SM 2011. The emergence of concurrent HIV-1/AIDS and visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 298-300.

Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, Arsenault AL, Kaushic C 2010. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog* 6: e1000852.

Neogy AB, Nandy A, Ghosh Dastidar B, Chowdhury AB. Antibody kinetics in kala-azar in response to treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 81: 727-729.

Nies-Kraske E, Schacker TW, Condoluci D, Orenstein J, Brenchley J, Fox C, Daucher M, Dewar R, Urban E, Hill B, Guenaga J, Hoover S, Maldarelli F, Hallahan CW, Horn J, Kottlilil S, Chun TW, Folino M, Palmer S, Wiegand A, O'Shea MA, Metcalf JA, Douek DC, Coffin J, Haase A, Fauci AS, Dybul M 2009. Evaluation of the pathogenesis of decreasing CD4<sup>(+)</sup> T cell counts in human immunodeficiency virus type 1-infected patients receiving successfully suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 199: 1648-1656.

- Nylén S, Maurya R, Eidsmo L, Manandhar KD, Sundar S, Sacks D 2007. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *J Exp Med* 204: 805-817.
- Northfield JW, Harcourt G, Lucas M, Klenerman P 2005. Immunology of viral co-infections with HIV. *Arch Immunol Ther Exp* 53: 3-12.
- Nunnari G, Nigro L, Palermo F, Attanasio M, Berger A, Doerr HW, Pomerantz RJ, Cacopardo B 2003. Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus co-infection correlates with an intact T-helper cytokine profile. *Ann Intern Med* 139: 26-30.
- Okazaki T, Wang J 2005. PD-1/PD-L pathway and autoimmunity. *Autoimmunity* 38: 353-357.
- Palmer BE, Blyveis N, Fontenot AP, Wilson CC 2005. Functional and phenotypic characterization of CD57<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells and their association with HIV-1-induced T cell dysfunction. *J Immunol* 175: 8415-8423.
- Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, Borrow P, Saag MS, Shaw GM, Sekaly RP 1994. Major expansion of CD8<sup>+</sup> T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* 370: 463-467.
- Pantaleo G, Demarest JF, Schacker T, Vaccarezza M, Cohen OJ, Daucher M, Graziosi C, Schnittman SS, Quinn TC, Shaw GM, Perrin L, Tambussi G, Lazzarin A, Sekaly RP, Soudeyns H, Corey L, Fauci AS 1997a. The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 254-258.
- Pantaleo G, Fauci AS 1996. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 50: 825-854.
- Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, Pizzo PA, Schnittman SM, Kotler DP, Fauci AS 1991. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9838-9842.
- Pantaleo G, Graziosi C, Demarest J, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 362: 355-358.



Pantaleo G, Soudeyns H, Demarest JF, Vaccarezza M, Graziosi C, Paolucci S, Daucher M, Cohen OJ, Denis F, Biddison WE, Sekaly RP, Fauci AS 1997b. Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones during primary HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9848-9853.

Papagno L, Spina CA, Marchant A, Salio M, Rufer N, Little S, Dong T, Chesney G, Waters A, Easterbrook P, Dunbar PR, Shepherd D, Emery V, Griffiths P, Conlon C, McMichael AJ, Richman DD, Rowland-Jones SL, Appay V 2004. Immune activation and CD8<sup>+</sup> T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol* 2: E20.

Pearce EL 2010. Metabolism in T cell activation and differentiation. *Curr Opin Immunol* 22: 314-320.

Peruhype-Magalhães V, 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 2006. 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* 146: 124-132.

Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, Precopio ML, Schacker T, Roederer M, Douek DC, Koup RA 2006. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 203: 2281-2292.

Petrovas C, Chaon B, Ambrozak DR, Price DA, Melenhorst JJ, Hill BJ, Geldmacher C, Casazza JP, Chattopadhyay PK, Roederer M, Douek DC, Mueller YM, Jacobson JM, Kulkarni V, Felber BK, Pavlakis GN, Katsikis PD, Koup RA 2009. Differential association of programmed death-1 and CD57 with ex vivo survival of CD8<sup>+</sup> T cells in HIV infection. *J Immunol* 183: 1120-1132.

Picker LJ 2006. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr Opin Immunol* 18: 399-405.

Picker LJ, Hagen SI, Lum R, Reed-Inderbitzin EF, Daly LM, Sylwester AW, Walker JM, Siess DC, Piatak M Jr, Wang C, Allison DB, Maino VC, Lifson JD, Kodama T, Axthelm MK 2004. Insufficient production and tissue delivery of CD4<sup>+</sup> memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med* 200: 1299-1314.

Piconi S, Trabattoni D, Gori A, Parisotto S, Magni C, Meraviglia P, Bandera A, Capetti A, Rizzardini G, Clerici M 2010. Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4<sup>+</sup> T-cell counts during antiretroviral therapy. *AIDS* 24: 1991-2000.

Plunkett FJ, Franzese O, Finney HM, Fletcher JM, Belaramani LL, Salmon M, Dokal I, Webster D, Lawson AD, Akbar AN 2007. The loss of telomerase activity in highly differentiated CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> T cells is associated with decreased Akt (Ser473) phosphorylation. *J Immunol* 178: 7710771-9.

Poropatich K, Sullivan DJ Jr 2011. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *J Gen Virol* 92: 247-268.

Ramzaoui S, Jouen-Beades F, Michot F, Borsa-Lebas F, Humbert G, Tron F 1995. Comparison of activation marker and TCR V beta gene product expression by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood and lymph nodes from HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol* 99: 182-188.

Rebai N, Pantaleo G, Demarest JF, Ciurli C, Soudeyns H, Adelsberger JW, Vaccarezza M, Walker RE, Sekaly RP, Fauci AS 1994. Analysis of the T-cell receptor beta-chain variable-region (V beta) repertoire in monozygotic twins discordant for human immunodeficiency virus: evidence for perturbations of specific V beta segments in CD4<sup>+</sup> T cells of the virus-positive twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1529-1533.

Reiner SL, Wang ZE, Hatam F, Scott P, Locksley RM 1993. TH1 and TH2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis. *Science* 259: 1457-1460.

Rodrigues DS, Cunha RM, Kallas EG, Salomão R 2003. Distribution of naive/effector CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and expression of CD38 on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in AIDS patients with tuberculosis. *Braz J Infect Dis* 7: 161-165.

Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T 2001. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 414: 920-924.

Romiti ML, Cancrini C, Castelli-Gattinara G, Di Cesare S, Bernardi S, De Gasperi MR, Halapi E, Rossi P 2001. Kinetics of the T-cell receptor CD4 and CD8 V beta repertoire in HIV-1 vertically infected infants early treated with HAART. *AIDS* 15: 2075-2084.

- Rosenthal E, Marty P, Del Giudice P, Pradier C, Ceppi C, Gastaut JA, Le Fichoux Y, Cassuto JP 2000. HIV and *Leishmania* co-infection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of *Leishmania*. *Clin Infect Dis* 31: 1093-1095.
- Rowen L, Koop BF, Hood L 1996. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 272: 1755-1762.
- Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N 2006. Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res* 123: 245-266.
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401: 708-712.
- Sandler NG, Koh C, Roque A, Eccleston JL, Siegel RB, Demino M, Kleiner DE, Deeks SG, Liang TJ, Douek DC 2011a. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology* 141:1220-1230.
- Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, Pedersen C, Ruxrungtham K, Lewin SR, Emery S, Neaton JD, Brenchley JM, Deeks SG, Sereti I, Douek DC; INSIGHT SMART Study Group 2011b. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis* 203: 780-790.
- Santos-Oliveira JR 2008. Identificação de parâmetros imunológicos aplicáveis ao monitoramento terapêutico da co-infecção *Leishmania*/HIV. Dissertação de mestrado.
- Saresella M, Rainone V, Al-Daghri NM, Clerici M, Trabattoni D 2012. The PD-1/PD-L1 Pathway in Human Pathology. *Curr Mol Med* 12: 259-267.
- Sassi A, Larguèche-Darwaz B, Collette A, Six A, Laouini D, Cazenave PA, Dellagi K 2005. Mechanisms of the natural reactivity of lymphocytes from noninfected individuals to membrane-associated *Leishmania infantum* antigens. *J Immunol* 174: 3598-3607.
- Sauce D, Almeida JR, Larsen M, Haro L, Autran B, Freeman GJ, Appay V 2007. PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *AIDS* 21: 2005-2013.
- Schacker TW, Brenchley JM, Beilman GJ, Reilly C, Pambuccian SE, Taylor J, Skarda D, Larson M, Douek DC, Haase AT 2006. Lymphatic tissue fibrosis is associated with

reduced numbers of naive CD4<sup>+</sup> T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Vaccine Immunol* 13: 556-560.

Schacker TW, Nguyen PL, Beilman GJ, Wolinsky S, Larson M, Reilly C, Haase AT 2002. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J Clin Invest* 110: 1133-1139.

Schacker TW, Reilly C, Beilman GJ, Taylor J, Skarda D, Krason D, Larson M, Haase AT 2005. Amount of lymphatic tissue fibrosis in HIV infection predicts magnitude of HAART-associated change in peripheral CD4 cell count. *AIDS* 19: 2169-2171.

Seder RA, Ahmed R 2003. Similarities and differences in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* 4: 835-842.

Silvestri G, Fedanov A, Germon S, Kozyr N, Kaiser WJ, Garber DA, McClure H, Feinberg MB, Staprans SI 2005. Divergent host responses during primary simian immunodeficiency virus SIVsm infection of natural sooty mangabey and nonnatural rhesus macaque hosts. *J Virol* 79: 4043-4054.

Sinha PK, Bimal S, Singh SK, Pandey K, Gangopadhyay DN, Bhattacharya SK 2006. Pre- & post-treatment evaluation of immunological features in Indian visceral leishmaniasis (VL) patients with HIV co-infection. *Indian J Med Res* 123: 197-202.

Sodora DL, Milush JM, Ware F, Wozniakowski A, Montgomery L, McClure HM, et al 2002. Decreased levels of recent thymic emigrants in peripheral blood of simian immunodeficiency virus-infected macaques correlate with alterations within the thymus. *J Virol* 76: 9981-9990.

Soudeyans H, Rebai N, Pantaleo GP, Ciurli C, Boghossian T, Sékaly RP, Fauci AS 1993. The T cell receptor V beta repertoire in HIV-1 infection and disease. *Semin Immunol* 5: 175-185.

Soudeyans H, Campi G, Rizzardi GP, Lenge C, Demarest JF, Tambussi G, Lazzarin A, Kaufmann D, Casorati G, Corey L, Pantaleo G 2000. Initiation of antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection induces rapid stabilization of the T-cell receptor beta chain repertoire and reduces the level of T-cell oligoclonality. *Blood* 95:1743-1751.

Sousa-Gomes ML, Maia-Elkhoury AN, Pelissari DM, Lima Junior FEF, Sena JM, Cechinel MP 2011. Co-infection *Leishmania*/HIV in Brazil: Epidemiological, Clinical and Laboratorial Aspects. *Epidemiol. Serv. Saúde* 20: 519-526.

Stevenson M 2003. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 9: 853-860.

UNAIDS. AIDS Epidemic Update 2010- Global Report. Acesso em abril de 2012. Disponível em: [www.unaids.org](http://www.unaids.org).

Teixeira L, Valdez H, McCune JM, Koup RA, Badley AD, Hellerstein MK, et al 2001. Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. *AIDS* 15: 1749-5176.

Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, Boulassel MR, Delwart E, Sepulveda H, Balderas RS, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12: 1198-1202.

Tumbarello M, Tacconelli E, Bertagnolio S, Cauda R 2000. Highly active antiretroviral therapy decreases the incidence of visceral leishmaniasis in HIV-infected individuals. *AIDS* 14: 2948-2949.

Uyemura K, Pirmez C, Sieling PA, Kiene K, Paes-Oliveira M, Modlin RL 1993. CD4<sup>+</sup> type 1 and CD8<sup>+</sup> type 2 T cell subsets in human leishmaniasis have distinct T cell receptor repertoires. *J Immunol* 151: 7095-7104.

Valdez H, Lederman M 1997. Cytokines and cytokine therapies in HIV infection. *AIDS Clin Rev*: 187-228.

Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, Rosenzweig M, Johnson RP, Desrosiers RC, Lackner AA 1998. Gastrointestinal tract as a major site of CD4<sup>+</sup> T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280: 427-431.

Ye P, Kirschner DE 2002. Measuring emigration of human thymocytes by T-cell receptor excision circles. *Crit Rev Immunol* 22: 483-497.

Yin L, Kou ZC, Rodriguez C, Hou W, Goodenow MM, Sleasman JW 2009. Antiretroviral therapy restores diversity in the T-cell receptor Vbeta repertoire of CD4 T-cell

subpopulations among human immunodeficiency virus type 1-infected children and adolescents. *Clin Vaccine Immunol* 16: 1293-1301.

Westby M, Vaughan AN, Balotta C, Galli M, Clerici M, Dalgleish AG 1998. Low CD4 counts rather than superantigenic-like effects account for differences in expressed T-cell receptor (TCR) repertoires between HIV-1 seropositive long-term non-progressors and individuals with progressive disease. *Br J Haematol* 102: 1187-1196.

Wolday D, Akuffo H, Demissie A, Britton S 1999. Role of *Leishmania donovani* and its lipophosphoglycan in CD4<sup>+</sup> T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. *Infect Immun* 67: 5258-5264.

Wolday D, Berthe N, Akuffo H, Britton S 1999. *Leishmania*-HIV Interactions: immunopathogenic mechanisms. *Parasitol Today* 15: 182-187.

Zhang L, Lewin SR, Markowitz M, Lin HH, Skulsky E, Karanicolas R, et al 1999. Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *J Exp Med* 190: 725-732.

Zhang JY, Zhang Z, Wang X, Fu JL, Yao J, Jiao Y, Chen L, Zhang H, Wei J, Jin L, Shi M, Gao GF, Wu H, Wang FS 2007. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8<sup>+</sup> T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* 109: 4671-4678.

Zhao C, Papadopoulou B, Tremblay MJ 2004. *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clin Immunol* 113: 81-88.

## **ANEXOS**

## **Anexo 1**

### **Artigo (publicado)**

**Título:** HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil.

**Autores:** Priscilla Alexandrino-de-Oliveira, Joanna R Santos-Oliveira, Maria Elizabeth Dorval, Francisco das Chagas Brandão da Costa, Gracy Regina Pereira, Rivaldo Venâncio da Cunha, Ana Maria Paniago, Alda M Da-Cruz

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2010; 105(5): 692-697.

### **RESUMO**

Um aumento na morbidade associada à leishmaniose visceral (LV) em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 tem sido descrita na África e no Mediterrâneo. Apesar da alta endemicidade da LV e do HIV-1 no Brasil, esta associação não vem sendo muito investigada. Nosso objetivo foi avaliar as características clínicas e epidemiológicas dos casos de LV-HIV-1/AIDS da região centro-oeste (Mato Grosso do Sul-MS) do Brasil. Prontuários médicos de 23 pacientes LV-HIV-1/AIDS foram revisados. Os pacientes foram predominantemente do sexo masculino (87%) e 34,8% deles eram usuários de drogas intravenosas (IVDU). A leishmaniose foi a primeira infecção oportunista em 60% dos pacientes infectados pelo HIV-1. A febre ocorreu em todos os pacientes, entretanto a esplenomegalia e a hepatomegalia foram ausentes em 21,7% dos casos. As contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> em 80% dos casos e as contagens não aumentaram após a remissão clínica, apesar da terapia antiretroviral. A primeira droga de escolha para tratar os casos foi o antimonial, mas o regime terapêutico foi alterado para anfotericina B em 12 dos 17 casos devido aos efeitos colaterais. As recidivas foram relatadas em 56,5% dos pacientes. O uso de drogas intravenosas pode constituir um importante fator de risco para a transmissão de ambas as doenças no MS. Os pacientes LV-HIV-1/AIDS do MS compartilham características clínicas similares às aquelas de outras regiões endêmicas ao redor do mundo. Dessa maneira, esses achados são importantes para melhorar a vigilância dos pacientes coinfectados LV-HIV-1/AIDS.



## HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil

Priscilla Alexandrino-de-Oliveira<sup>1,2</sup>, Joanna Reis Santos-Oliveira<sup>1</sup>, Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval<sup>3</sup>, Francisco das Chagas Brandão Da-Costa<sup>4</sup>, Gracy Regina Oliveira Leite Pereira<sup>2</sup>, Rivaldo Venâncio da Cunha<sup>5</sup>, Anamaria Mello Miranda Paniago<sup>5</sup>, Alda Maria Da-Cruz<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Hospital Universitário <sup>3</sup>Departamento de Patologia <sup>4</sup>Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil <sup>5</sup>Centro de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Prefeitura Municipal de Campo Grande, Campo Grande, MS, Brasil

*An increase in morbidity associated with visceral leishmaniasis (VL) in human immunodeficiency virus (HIV)/AIDS patients has been described in Africa and the Mediterranean. Despite the high endemicity of VL and HIV-1/AIDS in Brazil, this association has not been thoroughly investigated. Our aim was to evaluate the epidemiologic and clinical characteristics of VL-HIV-1/AIDS cases from Central-west [Mato Grosso do Sul (MS)] Brazil. Medical records of 23 VL-HIV-1/AIDS patients were reviewed. Patients were predominantly adult males (87%) and 34.8% of the patients were intravenous drug users (IVDU). Leishmaniasis was the first opportunistic infection in 60% of the HIV-1 patients. Fever occurred in all patients, although splenomegaly and hepatomegaly were absent in 21.7% of the cases. CD4<sup>+</sup> T-cell counts were below 200 cells/mm<sup>3</sup> in 80% of the cases and the counts did not increase after clinical remission despite antiretroviral therapy. The first drug chosen to treat the cases was antimonial, but the therapeutic regimen was altered to amphotericin B in 12 of 17 cases due to side effects. Relapses were reported in 56.5% of the patients. IVDU may constitute an important risk factor for the transmission of both diseases in MS. VL-HIV-1/AIDS patients in MS share similar clinical characteristics as those from other endemic regions worldwide. Thus, these findings are critical for improving the surveillance of VL-HIV/AIDS patients.*

Key words: HIV/AIDS - opportunistic infection - Brazil - visceral leishmaniasis - intravenous drug users - recurrence

New immunopathological aspects of visceral leishmaniasis (VL), also known as kala-azar, associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection have been reported, particularly for patients in Europe and Africa where the disease has emerged as an important opportunistic infection (Alvar et al. 1997, 2008, Cruz et al. 2006, ter Horst et al. 2008). The diagnosis of leishmaniasis, especially in co-infected individuals, continues to challenge physicians because VL shares similarities with other diseases included in the AIDS surveillance case definition, such as histoplasmosis, disseminated coccidioidomycosis or extrapulmonary tuberculosis (MS 2004a).

The cellular immune response is considered the main mechanism of defence against *Leishmania* sp. infection. Depending on the immunological status of the host, infection evolves either to spontaneous regression or to a

progressive disease (Olivier et al. 2003). Although VL is not considered an illness-defining case, HIV/AIDS patients are at high risk for this co-infection (Alvar et al. 1997, 2008). Compared to those who received no antiretroviral therapy, patients treated with highly active antiretroviral therapy (HAART) had a 59% reduction of risk for developing the disease (del Giudice et al. 2002). However, HAART did not prevent relapses in the HIV/AIDS patients who developed VL (Laguna 2003).

In Brazil, the most important *Leishmania* species causing VL is *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. The endemicity of VL in many Brazilian regions is high, but few reports have addressed the clinical features of HIV/AIDS-associated VL (Borges et al. 1999, Orsini et al. 2002, Rabello et al. 2003, Daher et al. 2009). Although the HIV/AIDS National Surveillance Program has been considered a success, HIV is still spreading in Brazil and reaching small cities; also, an urbanization of human leishmaniasis has been observed, resulting in an overlap of these two diseases (Rabello et al. 2003).

Much of the knowledge about HIV/AIDS-associated VL comes mainly from European studies (Cacopardo et al. 1996, del Giudice et al. 2002, Pasquau et al. 2005, Marques et al. 2007). Brazil, however, is a country that exhibits particular epidemiological features related to *Leishmania* species, to vectors involved in infection transmission and to at-risk populations, which can influence clinical course and therapeutic response. In this scenario, defining the clinical outcome of VL-HIV/AIDS in different regions of Brazil is of critical importance.

Financial support: UFMS, Programa Nacional de DST/AIDS/MS (ED00095/2007), IOC, CNPq, FAPERJ (E-26/103-111/2008)

+ Corresponding author: alda@ioc.fiocruz.br

Received 12 January 2010

Accepted 13 May 2010

In the last decade, Mato Grosso do Sul (MS), in Central-west Brazil, has emerged as an important endemic area for VL because of the increasing number and severity of reported cases (Oliveira et al. 2006) of this disease. Moreover, there is a high prevalence of AIDS in MS. In the present study, the aim was to evaluate a series of VL-HIV/AIDS cases from this region and to describe their epidemiological and clinical characteristics.

#### PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

**Patients** - We reviewed the medical records of 30 HIV-1/AIDS patients who were clinically suspected of having VL between January 2000-December 2006. The inclusion criteria included the detection of *Leishmania* parasites in HIV-1 patients with clinical suspicion of VL. Twenty-three of the 30 reviewed cases fulfilled these criteria and were included in this descriptive study. The following data were obtained by reviewing the clinical charts of these patients: demographic information (sex, age and geographical origin), category of HIV exposure, year of VL and HIV-1/AIDS diagnoses, clinical signs and symptoms, methods of parasitological diagnosis, laboratory tests, leishmaniasis treatment, antiretroviral therapy, T-cell counts, HIV plasma viral load and clinical outcome.

**Diagnosis criteria, clinical outcome and anti-leishmanial therapy** - According to the Brazilian Ministry of Health, HIV/AIDS patients were those with both a positive enzyme immunoassay and western blot assay for HIV and CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte counts under 350 cells/mm<sup>3</sup> (MS 2004b). VL diagnosis was determined by detecting parasites in the bone marrow (promastigote forms of *Leishmania* in Novy-MacNeal-Nicolle culture medium or amastigotes visualized in Giemsa-stained smears of cells obtained from a bone marrow aspirate). Fever was defined as an axillary temperature greater than 37.8°C. Leucopenia was defined as a leukocyte count of less than 3.000 mm<sup>3</sup>. Anaemia was defined as haemoglobin concentration of less than 10 g/dL. Thrombocytopenia was defined as platelet counts of less than 120.000 mm<sup>3</sup>. Albumin/globulin ratio was considered inverted when it was less than one.

Absolute counts of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes were determined using BD Tritest<sup>®</sup> monoclonal antibodies specific for CD4, CD8 and CD3, conjugated to FITC, PE and PerCP, respectively, and a BDTrue Count<sup>®</sup> reagent kit (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), according to the manufacturer's instructions. Samples were acquired using a FACSCalibur<sup>®</sup> (BD, USA) and analyzed by Multiset<sup>®</sup> software (BD, USA). HIV RNA copies in the plasma (viral load) were quantified by the nucleic acid sequence-based amplification technique (NASBA<sup>®</sup> Organon Teknica, Bostel, Holland) and the lower limit of detection was 400 copies/mL.

Evidence for a favorable response to therapy (clinical remission) was considered when the patient was afebrile and when physical signs as well as laboratory abnormalities either subsided or significantly improved after a complete course of treatment. Therapeutic failure was considered when the patient had a persistence of clinical

symptoms, laboratory records that remained unchanged and death due to leishmaniasis or related complications. Relapse of VL was defined as a new episode after successful treatment, which was confirmed microbiologically by the detection of *Leishmania* amastigotes in the bone marrow, irrespective of time of anti-leishmanial treatment discontinuation.

**Ethics** - The study was approved by the Ethical Committee of the Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (register 897). Informed consent was obtained from all patients.

#### RESULTS

The 23 participants in this study lived in MS and had not recently travelled outside the state. The majority of patients came from urban areas (17 cases from the MS capital, Campo Grande, and 2 cases from Corumbá). The median age was 37 years (range 21-56 years); 20 patients (87%) were male and eight (34.8%) had intravenous drug use as their HIV transmission category. In 10 cases (43%), VL and HIV were diagnosed at the same time. Five cases had a VL diagnosis between 1-5 years after HIV diagnosis, while eight presented with VL five or more years after HIV diagnosis. Viscerotropic *Leishmania* was the first opportunistic infection in 14 cases (60.1%). Fever occurred in all the patients, while splenomegaly and hepatomegaly were absent in 21.7% of the cases. Only 39.1% lost over 10 kg of body weight. In the 23 cases from which parasites were isolated by culture, 20 (87%) had amastigotes directly visualized in the cells of the bone marrow smears (Table I). Different degrees of anaemia, leucopenia, thrombocytopenia and abnormal serum levels of albumin and globulin were also noted (Table I).

The CD4<sup>+</sup> T-cell counts were very low (median 44.5 cells/mm<sup>3</sup>, range 5-460 cells/mm<sup>3</sup>, n = 20) and most patients (80%) were in an advanced immunosuppressive state (less than 200 cells/mm<sup>3</sup>). Only eight (34.8%) out of 23 patients were receiving HAART (2 nucleoside reverse transcriptase inhibitors and 1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors or 1 protease inhibitor) at the time of VL diagnosis. Despite HAART, plasma HIV viral load was high, over log three copies/mL in 87.5% of the patients, whereas only one out of eight cases presented with a suppressed plasma HIV viral load during the VL episode (Table I).

Meglumine antimonial (20 mg/kg/day for 30 days) was the first-choice drug for 17 patients and 12 of them had the therapeutic regimen altered to amphotericin B. Side effects led to a change in the therapeutic regimen in these 12 patients, especially those who had amylase levels higher than 123 UI/mL (7 cases). Four cases were treated only with amphotericin B (0.7-1 mg/kg accumulated dose during 28 days). Two patients did not receive anti-leishmanial treatment. One or two relapses were found for 13 out of 23 patients. However, 10 patients (43.5%) did not relapse up to one year after discontinuing anti-leishmanial therapy. Two patients died: one due to leishmaniasis a few hours after diagnosis and the other one due to an unrelated cause.

TABLE I  
Epidemiological, clinical and laboratorial findings of 23 patients with visceral leishmaniasis associated with AIDS in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil 2000-2006

Epidemiological, clinical and laboratorial characteristics	Frequency <sup>a</sup> /n	%
Gender		
Male	20/23	87
Female	3/23	13
Age in years		
20-40	16/23	69.6
41-60	7/23	30.4
Transmission category		
Intravenous drug user	8/23	34.8
Sexual	21/23	91.3
Clinical features		
Fever	23/23	100
Splenomegaly	18/23	78.3
Hepatomegaly	18/23	78.3
Weight loss $\geq$ 10 Kg	9/23	39.1
Laboratorial tests		
Hemoglobin $\leq$ 10 g/dL	16/20	80
$\geq$ 10 g/dL	4/20	20
Leucocytes $>$ 3,000/mm <sup>3</sup>	6/20	30
$<$ 3,000/mm <sup>3</sup>	14/20	70
Platelets $>$ 120,000/mm <sup>3</sup>	9/20	45
$<$ 120,000/mm <sup>3</sup>	11/20	55
Albumin/globulin ratio - normal ( $\geq$ 1)	2/18	11.1
- abnormal ( $\leq$ 1)	16/18	89.9
Parasites - bone marrow cells smears		
Giemsa stained smears - direct exam	20/23	87
Culture in Novy-MacNeal-Nicolle medium	23/23	100
Immunological status		
T CD4 <sup>+</sup> cells count $>$ 200/mm <sup>3</sup>	4/20	20
$<$ 200/mm <sup>3</sup>	16/20	80
Plasma viral load $>$ log 3 HIV RNA copies/mL	18/20	94.7
$<$ log 3 HIV RNA copies/mL	1/20	5.3

a: number of patients with positive results; HIV: human immunodeficiency virus; n: number of patients evaluated.

Six patients were evaluated two different times (active disease and clinical remission) (Table II). VL and HIV were diagnosed at the same time in three out of six patients and, because of this, only three were on HAART at the moment of CD4<sup>+</sup> T-cell count and HIV viral load evaluation. However, in the clinical remission phase of VL, all of these patients had already finished the anti-*Leishmania* therapy and were receiving HAART. Despite the antiretroviral therapy, no significant increase in CD4<sup>+</sup> T-cells was found during clinical remission and the CD4<sup>+</sup> T-cell count remained under 200 cells/mm<sup>3</sup> (Figure) and at the same level as during active VL disease. The viral

load levels for all these patients decreased significantly, but two of them still presented high HIV RNA copies (log 5). We also observed one relapse episode in four out of six patients and one patient experienced two episodes. Two co-infected patients presented with herpes zoster concomitant to anti-leishmanial therapy.

#### DISCUSSION

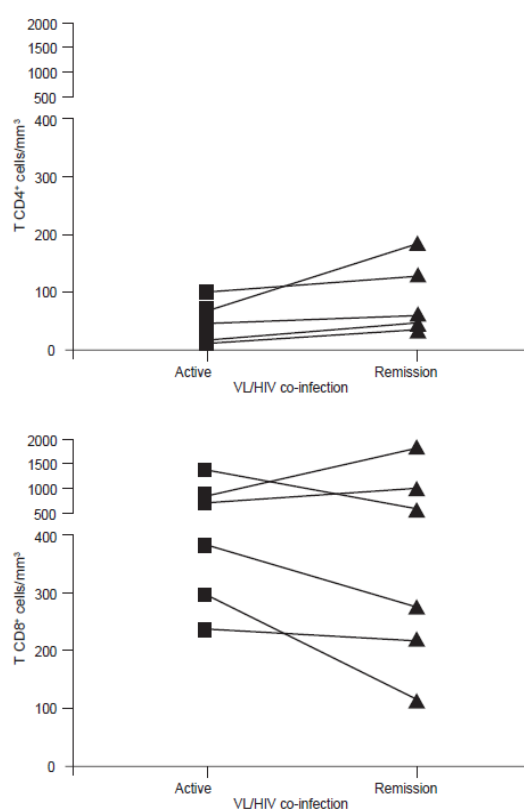
The development of the HIV/AIDS pandemic has modified the spectrum of leishmaniasis in the last 20 years in both clinical and epidemiological fields (Cruz et al. 2006, Alvar et al. 2008). The reported prevalence



TABLE II  
Laboratorial parameters for human immunodeficiency virus (HIV) infection evaluation in visceral leishmaniasis (VL) associated HIV infection patients

Patients number	Absolute counts of CD4 <sup>+</sup> T cells (mm <sup>3</sup> )		HIV viral load levels (log)	
	Active phase	Remission phase	Active phase	Remission phase
1 <sup>a</sup>	46	59	4.8	3.7
2 <sup>a</sup>	19	33	NR	5.5
3	102	129	4.5	2.5
4	44	61	4.4	2.2
5	18	45	6.1	5.3
6 <sup>a</sup>	75	187	NR	1.8

a: patients whose VL and HIV were diagnosed concomitantly; NR: not realized.



CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte counts of visceral leishmaniasis (VL) human immunodeficiency virus (HIV)/AIDS-associated patients suffering from active VL disease (■) and during clinical remission (▲).

of HIV/AIDS-associated leishmaniasis has increased in Brazil (Rabello et al. 2003). The epidemiological characteristics of *Leishmania* and HIV co-infection can differ from one endemic region to another due to parasite

strain, vector behavior or socio-environmental conditions of the exposed hosts. Here we described the main clinical and laboratorial features of parasitological confirmed cases of VL associated HIV/AIDS patients from endemic areas of *L. infantum chagasi* located in the Central-west region of Brazil.

The high incidence of VL in adult males may reflect the HIV infection patterns in Brazil (Rabello et al. 2003) and is similar to that found in patients from the Mediterranean basin (Cruz et al. 2006, Alvar et al. 2008). Additionally, some experimental models suggest that females might be less inclined to develop clinical symptoms of VL (Evans et al. 1992). The prevalence of intravenous drug users (IVDU) (34.8%) among the patients studied here was higher than that reported for other Brazilian endemic regions (Rabello et al. 2003). In Europe, it is known that people sharing needles are the main risk group for co-infection (Desjeux & Alvar 2003), yet IVDU accounts for only 6% of the HIV patients in MS. The increased occurrence of IVDU led to the idea that the anthroponotic cycle (Cruz et al. 2006) could play a relevant role in the transmission of both infections in this region. Investigating this causal relationship has great importance for defining prevention strategies, taking into consideration the transmission patterns in a Brazilian endemic area.

VL was the first opportunistic infection in 60.1% of the HIV/AIDS cases evaluated in the present study; in 43% of the cases, both diseases were diagnosed concomitantly. However, a relevant number of patients (8 cases) presented VL only years after HIV diagnosis, which can reflect the relatively recent introduction of VL in MS (Oliveira et al. 2006, Brustoloni et al. 2007). Patients had low levels of CD4<sup>+</sup> T-cells and most of them maintained detectable plasmatic HIV viral load even under HAART. These findings suggested that both infections would contribute to impair the effector immune function and consequently the ability to suppress the viral load. Overall, these data reinforced the idea that HIV/AIDS can be a predisposing condition for VL (Cacopardo et

al. 1996, Wolday et al. 1999, Barreto-de-Souza et al. 2006, Alvar et al. 2008) and the hypothesis that VL can be a predisposing condition for HIV/AIDS progression should also be considered. Therefore, improving the epidemiological surveillance of HIV infection among VL patients may lead to a precocious diagnosis before the onset of severe immunodeficiency.

Note that the main clinical manifestations reported in our study (fever, hepatosplenomegaly and weight loss) were similar to those observed for VL in non-HIV infected patients and for the Mediterranean VL-HIV/AIDS cases. Fever occurred in all cases in the series described here and was described in 67% of the patients in a study from the Brazilian Northeast Region (Daher et al. 2009) and in 75% of European co-infected patients in another study (Cruz et al. 2006). Enlargement of the liver and especially the spleen seems to be less frequent in VL-HIV/AIDS patients than in VL patients without AIDS (Pintado et al. 2001) and this enlargement may be associated with a deficient proliferative response of mononuclear cells in these organs (Peters et al. 1990). Atypical manifestations at unusual anatomic sites such as skin, gastrointestinal tract or lungs (Orsini et al. 2002, Herrejón et al. 2005) were not observed in this study.

Identifying VL cases in AIDS patients can be difficult because some drugs used to treat opportunistic infections or even HIV itself may be leishmanicidal and can affect the performance of parasitological methods (Savoia et al. 2005). Despite having clinical evidence of VL, seven patients were excluded from this study and only 23 parasitological confirmed cases were included. Even in patients known to be infected, as demonstrated by isolating parasites by culture, the direct examination of bone marrow smears failed to confirm the infection in three patients. This discrepancy indicates that a gold-standard method for VL diagnosis may not detect all cases of leishmaniasis, particularly disease in HIV/AIDS patients.

Developing a more effective therapeutic scheme for VL-HIV/AIDS patients and enhancing the benefits of secondary prophylaxis drugs to prevent relapses remain a challenge for researchers (Laguna 2003, Rosenthal & Marty 2003, Alvar et al. 2008). In this study, pentavalent antimony and amphotericin B deoxycholate were the drugs of choice and were prescribed according to Brazilian guidelines. The efficacy of the therapeutic approach could not be ascertained, although the lethality among the patients studied was low in comparison to that in other reports (Bourgeois et al. 2008, ter Horst et al. 2008). Antimonial toxicity is increased in HIV patients and pancreatitis, renal failure and myocarditis were the most commonly reported adverse effects. The antimonial was efficacious for five patients, but the drug was discontinued in 12 cases due to therapeutic failure (5 cases) or precocious increase in amylase levels (7 cases). Since the risk factors for predicting side effects are unknown, we cannot rule out that the approach was a precocious discontinuation of the antimonial. Here amphotericin B deoxycholate seemed to be more efficacious than the pentavalent antimony, although clinical trials failed to show differences in cure rates of VL in HIV-infected pa-

tients (Laguna 2003). Other drugs such as amphotericin B in lipid formulation may be promising (Berman 1999, Sundar et al. 2006, Alvar et al. 2008).

A patient's severely immunocompromized state may account for the tissue parasite maintenance and predisposition to frequent relapses observed in VL-associated HIV/AIDS-patients (ter Horst et al. 2008). VL patients without associated conditions tended to regain tissue lymphopoietic functions soon after anti-leishmanial therapy (Carvalho et al. 1994). Conversely, in our study, in spite of HAART and satisfactory anti-leishmanial therapy, no significant increase in CD4<sup>+</sup> T-cells was observed in VL-HIV/AIDS patients even during clinical remission. Baseline CD4<sup>+</sup> T-cells under 100 cells/mm<sup>3</sup> and poor CD4<sup>+</sup> T count recovery despite HAART were considered risk factors for relapse and death in co-infected patients in Ethiopia (ter Horst et al. 2008). Thus, the high rate of relapses could be associated with the inability to control parasite replication due to impaired reconstitution of the *Leishmania*-specific lymphocyte repertoire. These features could provide a rationale for introducing secondary prophylaxis (Bourgeois et al. 2008).

According to our findings, AIDS-associated VL patients from urban areas of MS seem to share clinical aspects with those from European endemic regions, suggesting that the parasite species circulating in these regions do not influence the clinical course of the disease. The prevalence of IVDU among co-infected patients in MS indicates that this route of transmission can have a relevant epidemiological impact on both diseases. Therefore, our results call for further AIDS-associated VL epidemiological research targeting the history of exposure in endemic areas with different epidemiological characteristics. Focusing on these specific factors will improve the surveillance of VL-HIV/AIDS patients.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, IOC-Fiocruz, and to Programa de Leishmanioses, SVS, MS, Brazil.

#### REFERENCES

- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21: 334-359.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 10: 298-319.
- Barreto-de-Souza V, Pacheco GJ, Silva AR, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Saraiva EM, Bou-Habib DC 2006. Increased *Leishmania* replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *J Infect Dis* 194: 846-854.
- Berman JD 1999. US Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 28: 49-51.
- Borges AS, Machado AA, Ferreira MS, de Castro Figueiredo JF, Silva GF, Cimerman S, Bacha HA, Teixeira MC 1999. Concurrent leishmaniasis and human immunodeficiency virus (HIV) infection: a study of four cases. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 713-719.

- Bourgeois N, Lachaud L, Reynes J, Rouanet I, Mahamat A, Bastien P 2008. Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction and potential impact on secondary prophylaxis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48: 13-19.
- Brustoloni YM, Lima RB, da Cunha RV, Dorval ME, Oshiro ET, de Oliveira ALL, Pirmez C 2007. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 497-500.
- Cacopardo B, Nigro L, Preiser W, Famá A, Satariano MI, Braner J, Celesia BM, Weber B, Russo R, Doerr HW 1996. Prolonged Th2 cell activation and increased viral replication in HIV-*Leishmania* co-infected patients despite treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 434-435.
- Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG 1994. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 152: 5949-5956.
- Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J 2006. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* 123: 357-388.
- Daher EF, Fonseca PP, Gerhard ES, Leitão TM, Silva Júnior GB 2009. Clinical and epidemiological features of visceral leishmaniasis and HIV co-infection in fifteen patients from Brazil. *J Parasitol* 95: 652-655.
- del Giudice P, Mary-Krause M, Pradier C, Grabar S, Dellamonica P, Marty P, Gastaut JA, Costagliola D, Rosenthal E 2002. 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* 186: 1366-1370.
- Desjeux P, Alvar J 2003. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 97 (Suppl. 1): 3-15.
- Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa A de A, Lima JW, Pearson RD 1992. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. *J Infect Dis* 166: 1124-1132.
- Herrejón A, Cervera A, Maciá M, Ferrer R, Blanquer R 2005. Bronchioloalveolar adenoma associated with bronchiolitis obliterans and leishmaniasis with lung involvement in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Bronconeumol* 41: 233-235.
- Laguna F 2003. Treatment of leishmaniasis in HIV-positive patients. *Ann Trop Med Parasitol* 97 (Suppl. 1): 135-142.
- Marques N, Cabral S, Sá R, Coelho F, Oliveira J, Saraiva da Cunha JG, Meliço Silvestre A 2007. Visceral leishmaniasis and HIV infection in the HAART era. *Acta Med Port* 20: 291-298.
- MS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde 2004a. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Leishmania*-HIV, Brasília. Programa Nacional de DST/HIV/Aids. Available from: [portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_leish\\_hiv.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_hiv.pdf).
- MS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde 2004b. Critérios para definição de casos de AIDS em adultos e crianças. Programa Nacional de DST/HIV/Aids. Available from: [aids.gov.br/data/documents](http://aids.gov.br/data/documents).
- Oliveira AL, Paniago AM, Dorval ME, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M, Cunha RV, Bóia MN 2006. Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 446-450.
- Olivier M, Badaró R, Medrano FJ, Moreno J 2003. The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. *Ann Trop Med Parasitol* 97 (Suppl. 1): 79-98.
- Orsini M, Silva M, Luz ZM, Disch J, Fernandes O, Moreira D, Guedes AC, Rabello A 2002. Identification of *Leishmania chagasi* from skin in *Leishmania*/HIV co-infection: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 259-262.
- Pasquau F, Ena J, Sanchez R, Cuadrado JM, Amador C, Flores J, Benito C, Redondo C, Lacruz J, Abril V, Onofre J 2005. Leishmaniasis as an opportunistic infection in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodes in a Mediterranean region. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24: 411-418.
- Peters BS, Fish D, Golden R, Evans DA, Bryceson AD, Pinching AJ 1990. Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. *Q J Med* 77: 1101-1111.
- Pintado V, Martín-Rabadán P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E 2001. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore)* 80: 54-73.
- Rabello A, Orsini M, Disch J 2003. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol* 97 (Suppl. 1): 17-28.
- Rosenthal E, Marty P 2003. Recent understanding in the treatment of visceral leishmaniasis. *J Postgrad Med* 49: 61-68.
- Savoia D, Allice T, Tovo PA 2005. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* 26: 92-94.
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Bhattacharya SK, Rai M 2006. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100 (Suppl. 1): S26-33.
- ter Horst R, Collin SM, Ritmeijer K, Bogale A, Davidson RN 2008. Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. *Clin Infect Dis* 46: 1702-1709.
- Wolday D, Akuffo H, Demissie A, Britton S 1999. Role of *Leishmania donovani* and its lipophosphoglycan in CD4<sup>+</sup> T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. *Infect Immun* 67: 5258-5264.



## Anexo 2

### Artigo (publicado)

**Título:** Evaluation of cellular phenotypes implicated in immunopathogenesis and monitoring immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV/leprosy cases.

**Autores:** Carmem Beatriz Giacoia-Gripp, Anna Maria Sales, José Augusto da Costa Nery, Joanna R Santos-Oliveira, Ariane Leite de Oliveira, Euzenir N Sarno, Mariza G Morgado.

PLoS One 2011; 6(12): e28735.

### RESUMO

**Introdução:** Agora é evidente que a melhora imunológica associada à TARV frequentemente resulta em uma variedade de manifestações clínicas novas, coletivamente denominadas como síndrome inflamatória da reconstituição imune ou IRIS. Este fenômeno já foi descrito em casos de coinfeção do HIV-1 com o *Mycobacterium leprae*, a maioria deles pertencendo ao espectro tuberculóide da hanseníase, conforme observado na chamada reação reversa (RR). Entretanto, os eventos relacionados à patogênese dessa associação precisam ser esclarecidos. Este estudo investigou o perfil imunológico dos pacientes HIV/hanseníase, com atenção especial para o *status* de ativação celular, para melhor entender os mecanismos relacionados à imunopatogênese da IRIS/RR, identificando algum potencial biomarcados para tal intercorrência. **Métodos/Principais resultados:** Oitenta e cinco pacientes foram avaliados neste estudo: HIV/hanseníase e monoinfectados para HIV, agrupados de acordo com a carga viral, pacientes com hanseníase sem HIV e controles saudáveis. Os fenótipos foram avaliados por citometria de fluxo para as subpopulações de linfócitos T e para os marcadores de diferenciação/ativação. Como esperado, as contagens absolutas de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> dos indivíduos infectados pelo HIV diferiu daquelas observadas para os pacientes de hanseníase e controles. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos, seja na expressão dos fenótipos de diferenciação ou no de ativação celular, como refletido pela expressão de CD38 e HLA-DR. Seis pacientes HIV/hanseníase identificados como IRIS/RR foram analisados durante os episódios de IRIS/RR e após o tratamento com prednisona. Estes pacientes apresentaram níveis elevados de ativação celular no que se refere à expressão de CD38 em células T CD8<sup>+</sup> durante a IRIS/RR (mediana: 77,15%), diminuindo significativamente ( $p < 0,05$ ) após os momentos de IRIS/RR (mediana: 29,7%). Além disso, um aumento na ativação celular parece ocorrer anteriormente ao episódio de IRIS/RR. **Conclusão:** Esses dados sugerem que a expressão de CD38 nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> uma ferramenta interessante na identificação de pacientes HIV/hanseníase sob risco de IRIS/RR. Então, uma investigação comparativa a pacientes a pacientes com hanseníase em RR deve ser conduzida.

# Evaluation of Cellular Phenotypes Implicated in Immunopathogenesis and Monitoring Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in HIV/Leprosy Cases

Carmem Beatriz Wagner Giacoia-Gripp<sup>1\*</sup>, Anna Maria Sales<sup>2</sup>, José Augusto da Costa Nery<sup>2</sup>, Joanna Reis Santos-Oliveira<sup>3</sup>, Ariane Leite de Oliveira<sup>2</sup>, Euzenir Nunes Sarno<sup>2</sup>, Mariza Gonçalves Morgado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>2</sup> Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>3</sup> Laboratory of Interdisciplinary Medical Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

## Abstract

**Background:** It is now evident that HAART-associated immunological improvement often leads to a variety of new clinical manifestations, collectively termed *immune reconstitution inflammatory syndrome*, or IRIS. This phenomenon has already been described in cases of HIV coinfection with *Mycobacterium leprae*, most of them belonging to the tuberculoid spectrum of leprosy disease, as observed in leprosy reversal reaction (RR). However, the events related to the pathogenesis of this association need to be clarified. This study investigated the immunological profile of HIV/leprosy patients, with special attention to the cellular activation status, to better understand the mechanisms related to IRIS/RR immunopathogenesis, identifying any potential biomarkers for IRIS/RR intercurrent.

**Methods/Principal Findings:** Eighty-five individuals were assessed in this study: HIV/leprosy and HIV-monoinfected patients, grouped according to HIV-viral load levels, leprosy patients without HIV coinfection, and healthy controls. Phenotypes were evaluated by flow cytometry for T cell subsets and immune differentiation/activation markers. As expected, absolute counts of the CD4+ and CD8+ T cells from the HIV-infected individuals changed in relation to those of the leprosy patients and controls. However, there were no significant differences among the groups, whether in the expression of cellular differentiation phenotypes or cellular activation, as reflected by the expression of CD38 and HLA-DR. Six HIV/leprosy patients identified as IRIS/RR were analyzed during IRIS/RR episodes and after prednisone treatment. These patients presented high cellular activation levels regarding the expression of CD38 in CD8+ cells T during IRIS/RR (median: 77,15%), dropping significantly ( $p < 0,05$ ) during post-IRIS/RR moments (median: 29,7%). Furthermore, an increase of cellular activation seems to occur prior to IRIS/RR.

**Conclusion/Significance:** These data suggest CD38 expression in CD8+ T cells interesting tool identifying HIV/leprosy individuals at risk for IRIS/RR. So, a comparative investigation to leprosy patients at RR should be conducted.

**Citation:** Giacoia-Gripp CBW, Sales AM, Nery JA, Santos-Oliveira JR, de Oliveira AL, et al. (2011) Evaluation of Cellular Phenotypes Implicated in Immunopathogenesis and Monitoring Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in HIV/Leprosy Cases. PLoS ONE 6(12): e28735. doi:10.1371/journal.pone.0028735

**Editor:** Geetha P. Bansal, Tulane University, United States of America

**Received:** July 11, 2011; **Accepted:** November 14, 2011; **Published:** December 21, 2011

**Copyright:** © 2011 Giacoia-Gripp et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This project was supported by the Oswaldo Cruz Foundation Integrated AIDS Program/Brazilian Ministry of Health. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

\* E-mail: carmembg@ioc.fiocruz.br

## Introduction

The introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) for HIV infection in the mid-1990s is associated with clinical benefits, including the resolution of opportunistic infections and malignancies and the decline in hospitalizations and mortality rates [1]. These benefits are, in part, associated with the suppression of HIV viremia and the improvement of the immune function, as indicated by increases in total CD4+ T cell counts [2]. However, it is now also evident that the HAART-associated increase in immunity often leads to a variety of new clinical manifestations as a result of the dysregulation of the immune

system or an inflammatory response to both intact subclinical pathogens and residual antigens [3]–[5]. These manifestations have been collectively termed immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) because the phenomenon occurs during HAART-induced immune recovery and involves a host inflammatory response [6]. An increasing number of conditions are reported as IRIS events, and these most frequently occur in conjunction with mycobacterial (tuberculosis or *Mycobacterium avium complex* infection) and cryptococcal diseases [7]. Prior to the HAART era, there was ample appreciation that improvements in the immune function could result in pathological inflammation. These so-called paradoxical reactions were well described among



non-HIV-infected patients treated for *Mycobacterium tuberculosis* infection [8]. Clinical worsening in these patients following the initiation of anti-*M. tuberculosis* therapy had been attributed to a reversal of the immunosuppression induced by this infection.

Despite numerous descriptions of IRIS conditions, its pathogenesis remains largely unknown. It is now accepted, however, that it involves a combination of immune restoration activities following HAART, an underlying antigenic burden, and host genetic susceptibility [7].

The presence of an antigenic stimulus for the development of the syndrome appears to be necessary and may derive from an infectious or noninfectious agent. The source of this antigenic stimulus could be intact, "clinically silent" organisms or dead or dying organisms and their residual antigens [4], [5]. Although uncommon, our group and others have previously described the IRIS phenomenon in cases of HIV coinfection with *Mycobacterium leprae* [9]–[14]. The majority of these reported cases belong to the tuberculoid spectrum of leprosy, implying that a good host immune response is involved in this pathological condition. The coexisting type I leprosy reaction in these individuals further supports the idea that the recovery of the immunological system causes this paradoxical response. Similarly to *M. tuberculosis*, leprosy reaction most often occurs during multidrug chemotherapy in both paucibacillary and multibacillary patients [15]. Paucibacillary cases develop a type 1 or leprosy reversal reaction (RR) while a type 2 reaction develops in multibacillary patients. In RR, the level of cell-mediated immunity against *M. leprae* is suddenly elevated, resulting in an inflammatory response in the skin and nerves affected by the disease. Inflammatory reactions during treatment are, therefore, routine in *M. leprae*-infected patients.

The pathogenic mechanism receiving the most attention involves the theory that IRIS is precipitated by the extent of immune restoration following HAART. Some studies suggest that differences in baseline CD4+ cell numbers at the beginning of HAART are responsible [16], [17]. Alternatively, immunological mechanisms may involve qualitative changes in lymphocyte function or phenotypic expression, e.g., an increase in memory CD4+ cells, which are primed to recognize previous antigenic stimuli [18]. Therefore it can be deduced that other immunological factors may be involved in the pathogenesis of IRIS. Chronic immune activation is a characteristic of HIV disease progression, which is strongly correlated to HIV RNA levels that decrease as a result of HAART-induced virological suppression [19]–[21]. In fact, immune activation has been considered an important cause of HIV pathogenesis [22], [23]. Differential expression of cellular activation markers during IRIS/leprosy reversal reaction (IRIS/RR) episodes should reflect the risk of developing this paradoxical disease.

This study was designed to evaluate the immunological profile of HIV/leprosy patients, paying particular attention to cellular activation states, to better understand the mechanisms leading to IRIS/RR immunopathogenesis. We also aimed to identify any potential parameters such as immunophenotypic markers associated with the occurrence of IRIS/RR to enable the development of diagnostic criteria and prevention strategies. A clear understanding of IRIS pathogenesis is required to investigate its cause, recognize which individuals are at risk, and develop effective treatment strategies.

## Methods

### Ethics Statement

Protocol was approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethics Committee, which is affiliated to the Brazilian National Ethics

Council, under protocol no. 440/08. Written informed consent was provided by each individual participant before sample collection and study procedures began.

### Study Groups

Eighty-five individuals were assessed in this study, 42 of whom were HIV/leprosy coinfecting. Seven leprosy patients (without HIV coinfection), 20 healthy individuals, and 16 previously-studied HIV patients [24] (without leprosy coinfection) were included as controls. In accordance with the Brazilian Ministry of Healthy Consensus Therapy guidelines, all HIV-infected patients were under a 3-or-more antiretroviral drug regimen at the time of enrollment, either with or without protease inhibitors, except for 7 HIV/leprosy coinfecting individuals. The leprosy and HIV/leprosy patients were followed at the Souza Araújo Out-patient Unit (Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

Because our focus was the immunological profile of the patients, especially their immune activation status [20], [21], which may alter as a result of HIV replication and viral load levels, the HIV/leprosy-coinfecting individuals were first grouped according to their HIV viral load levels regardless of HAART status. The patients were classified as belonging to group 1 when their viral load (VL) levels were <80 copies/ml (n=24), as group 2 when their VL levels were  $\geq 80 < 10,000$  copies/ml (n=12), and group 3, when the patients presented VL levels  $\geq 10,000$  copies/ml (n=6). Similarly, HIV-monoinfected individuals were divided into 2 groups: the undetectable VL group whose VL levels were the limit of detection (VL<LD), and the detectable VL group (VL $\geq$ LD) whose VL values were  $\geq 80$  copies/ml.

In light of their clinical leprosy status, HIV/leprosy patients were classified by way of Ridley and Jopling criteria in the absence of any RR symptoms as IRIS/RR at the time of RR, and post-IRIS/RR at the completion of treatment with glyocorticoid prednisone 6 months afterward. The 7 leprosy patients were also evaluated according to Ridley-Jopling criteria.

### Viral Load Evaluation

Quantification of the plasma viral load was determined for all HIV/leprosy coinfecting patients at each visit using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA, Organon Teknika, Bostel, The Netherlands), which has a lower detection limit of 80 copies/ml.

### Flow cytometry analysis

Lymphocytes were immunolabeled using a combination of CD4-Cy-chrome, (PE-Cy5, IgG1, clone RPA-T4) and CD8-Cy-chrome (PE-Cy5, IgG1, clone RPA-T8) antibodies to discriminate among the T cell populations. CD45RA- fluorescein isothiocyanate (FITC, clone HI100, IgG2b) and CD45RO-phycoerythrin (PE, clone UCHL1, IgG2a) (BD-Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) were used to define cellular differentiation status and dual-color staining with CD8 (FITC, IgG1, clone MCD8) and CD38 (PE, IgG1, clone T16) or CD3 (FITC, IgG2b, clone UCHT1) and HLA-DR (PE, IgG2a, clone BRA30) (IQ Products, Groningen, The Netherlands) antibodies to analyze cellular activation. Five microliters of each antibody were distributed among the sample tubes, and 50  $\mu$ l of fresh peripheral blood (in EDTA) was added. The samples were then mixed gently and incubated for 30 min at room temperature in the dark. Cell lysis was performed by adding 450  $\mu$ l of FACS Lysing solution<sup>TM</sup> (BD Biosciences). Samples were then washed twice in PBS solution and fixed with PBS plus 1% paraformaldehyde, prior to acquisition on a FACSCalibur (BD Biosciences). At least 10,000 events were acquired in a lymphocyte gate, and phenotypic analysis was carried out using

CellQuest™ software (BD). The percentages of CD38+ and HLA-DR+ cells were determined for the CD8+ and CD3+ T cell populations, respectively.

For CD3+/CD4+ and CD3+/CD8+ T cell subpopulations, the single-platform method was used to determine absolute counts. Briefly, 20 µl of TriTEST (BD-Biosciences) three-color (CD4-FITC, CD8-PE, and CD3-PerCP) antibodies and 50 µl of whole blood were added to bead-containing TruCount tubes (BD Biosciences). These were incubated for 15 min at room temperature before 450 µl of FACS Lysing solution™ was added. Samples were analyzed within 1 hour.

**Results**

**Epidemiological, clinical and T cell immunological parameters of the groups studied**

Forty-two (30 men and 12 women) HIV/leprosy-coinfected individuals with a median age of 39.5 (range: 21–69 years) were evaluated at the time of leprosy diagnosis. The diagnosis of leprosy was determined subsequent to the detection of HIV positivity in 40 of these individuals. Nearly half of these patients were diagnosed with leprosy prior to undergoing HAART while the other half was diagnosed as leprosy patients after HAART. In light of the classification criteria proposed by Talhari et al [25] for HIV/leprosy coinfecting patients, the first half would be defined as having *M. leprae*-HIV true coinfection while the second half would be considered as having HAART-related leprosy.

According to the clinical status of leprosy and the absence of any RR symptoms by way of the Ridley and Jopling classification system, 26 of the 42 HIV/leprosy patients (61.9%) presented the borderline tuberculoid (BT) form, while 3 individuals (7.1%) presented the undetermined form, corresponding to the paucibacillary patients. With respect to the multibacillary patients, 6 (14.3%) were mid-borderline (BB), 4 (9.4%) presented the borderline lepromatous form (BL), and 3 (7.1%), the lepromatous (LL) form. For the multibacillary patients, the initial bacillary index median was 1.75, ranging from 0.5 to 4.83. Neurological impairment was absent in 64.3% of the patients at the outset of treatment. Among the 7 leprosy non-HIV patients, different clinical profiles were observed, including BT, BB, and LL.

Indeed, 35 of the 42 HIV/leprosy individuals were under HAART at the time of enrollment, the majority (57.1%) being administered the 3-drug regimen including zidovudine, lamivudine, and efavirenz, following the Brazilian Ministry of Health guidelines. The other patients were under other therapeutic schemes that included protease inhibitors. However, no differences were observed in the VL levels of patients administered different HAART regimens.

In order to evaluate T cell immunological parameters, all 85 individuals were primarily evaluated to quantify their CD3+/CD4+ and CD3+/CD8+ T cell subpopulations. The median absolute counts are presented in Table 1. The HIV/leprosy-infected individuals showed a significant reduction in CD4+ T cell absolute counts ( $p < 0.05$ ) regardless of VL levels (group 1 median: 336 cells/mm<sup>3</sup>; group 2 median: 341 cells/mm<sup>3</sup>; group 3 median: 285 cells/mm<sup>3</sup>) in comparison to the leprosy patients (median: 1079 cells/mm<sup>3</sup>) and the healthy controls (median: 813 cells/mm<sup>3</sup>). This CD4+ T cell absolute reduction is a typical characteristic of HIV infection. No differences in the CD4+ T cell absolute count distribution profiles were detected among the HIV/leprosy-coinfected and HIV-monoinfected groups.

For CD8+ T cell absolute counts, lower values ( $p < 0.01$ ) were observed in group 1 (median: 783 cells/mm<sup>3</sup>) and group 2 (median: 734 cells/mm<sup>3</sup>) of the HIV/leprosy patients relative to the VL $\geq$ LD HIV-monoinfected ones (median: 1410 cells/mm<sup>3</sup>). Furthermore, HIV/leprosy group 1 had higher CD8+ T cell counts ( $p < 0.05$ ) when compared to those of the leprosy patients (median: 542 cells/mm<sup>3</sup>). As expected, all HIV/leprosy patients had significantly higher CD8+ T cell absolute counts ( $p < 0.05$ ) than the healthy individuals (median: 488 cells/mm<sup>3</sup>).

Cellular differentiation status was investigated by analyzing the surface expression of the CD45RA and CD45RO molecules in both CD4+ and CD8+ subpopulations (Table 1). For CD4+ T cells, frequency differences among CD45RA+ circulating cells were observed only when comparing groups 1 and 2 of the HIV/leprosy patients (medians: 22.4%, versus 37.7%;  $p < 0.05$ ), with the latter group showing a higher percentage of circulating cells. On the other hand, the CD45RO+ fraction of CD4+ T cells did not show any statistical differences among the study groups (Table 1).

**Table 1.** Median and interquartile range (IQR) of T cell immunophenotyping percentage values or absolute counts obtained from HIV/leprosy individuals according to viral load (VL) values and from HIV-monoinfected, leprosy patients and healthy controls.

	HIV/Leprosy			HIV-monoinfected		Leprosy	Healthy Controls
	Group 1	Group 2	Group 3	VL<LD	VL>LD	(n = 7)	(n = 20)
	(n = 24)	(n = 12)	(n = 6)	(n = 10)	(n = 6)		
CD3+/CD4+	336 (265–525)	341 (260–488)	285 (141–428)*	392 (379–450)	188 (109–300)	1079 (500–1533)*,†,‡	813 (703–942)*,†,‡
CD3+/CD8+	785 (462–1032)	734 (481–944)	921 (730–1303)	907 (792–1288)	1410 (1214–1864)*,†	542 (303–608)*,‡	488 (410–573)*,†,‡
CD4+/CD45RA+	22.4 (16.3–32.9)	37.7 (24.0–42.2)*	22.8 (15.4–33.3)	25.8 (19.0–31.6)	27.7 (20.2–33.0)	21.6 (16.7–27.5)	31.8 (19.8–44.9)
CD4+/CD45RO+	66.1 (55.1–80.5)	63.1 (53.4–71.6)	53.9 (46.7–63.3)	64.6 (59.6–75.1)	76.6 (70.9–83.2)	71.7 (58.8–75.6)	58.8 (45.6–74.6)
CD8+/CD45RA+	37.6 (32.5–40.8)	46.2 (40.0–50.5)	27.3 (22.6–41.3)	44.4 (40.1–48.3)*	36.8 (26.7–53.6)†	45.7 (37.73–49.4)	47.4 (42.5–62.0)*
CD8+/CD45RO+	51.5 (41.0–64.2)	53.8 (45.5–65.0)	54.6 (44.9–64.7)	54.4 (42.9–62.4)	68.5 (40.5–81.3)	39.4 (31.5–48.1)	46.7 (34.0–54.2)
CD3+/HLA-DR+	19.3 (13.4–25.2)	16.4 (10.6–19.1)	39.3 (25.5–58.5)*,†	13.2(9.9–17.4)†	13.8 (9.2–18.5)†	5.8 (4.9–19.8)†	8.4 (6.5–13.9)*,†,‡
CD8+/CD38+	28.9 (15.1–37.5)	37.2 (26.0–68.3)	66.7 (60.2–80.4)*	53.3 (47.2–55.8)*	59.3 (57.7–64.6)*	26.1 (23.0–33.4)†	8.7(4.2–13.4)*,†,‡

\* $p < 0.05$  – Mann-Whitney *U* test: groups versus Group 1 HIV/leprosy individuals (VL<LD);  
 † $p < 0.05$  – Mann-Whitney *U* test: groups versus Group 2 HIV/leprosy individuals (VL $\geq$ 80<10,000 copies/ml);  
 ‡ $p < 0.05$  – Mann-Whitney *U* test: groups versus Group 3 HIV/leprosy individuals (VL $\geq$ 10,000 copies/ml);  
 LD: limit of detection.  
 doi:10.1371/journal.pone.0028735.t001



On the other hand, the CD45RA+ fraction of the CD8+ T cells was found to differ among the groups (Table 1). HIV/leprosy group 1 had a lower percentage of CD45RA+ cells than the VL<LD HIV-monoinfected and healthy individuals (medians: 37.6%, versus 44.4% and 47.4%, respectively;  $p<0.05$ ). On the other hand, the group 2 HIV/leprosy individuals had significantly more CD8+CD45RA+ T cells than the VL $\ge$ LD HIV-monoinfected individuals (medians: 46.2%, versus 36.8%;  $p<0.0001$ ). No differences were observed in the proportion of circulating CD45RO+ CD8+ T cells among the various study groups, however.

Activation parameters were also evaluated in this study, including the total CD3+ T cell numbers, HLA-DR expression, and, for CD8+ cells, the expression of CD38. Because the expression of these activation markers, especially CD38, correlates strongly with HIV replication and viral load levels [19], [20], the HIV/leprosy-coinfected individuals were also evaluated according to their different VL levels.

As shown in Table 1 and Figure 1, a high frequency of CD3+ T cells expressing HLA-DR was observed in group 3 HIV/leprosy-infected individuals, in contrast to group 1 and group 2 (medians: 39.3%, versus 19.3% and 16.4%, respectively;  $p<0.05$ ). In addition, higher levels of HLA-DR expression were also observed in groups 1 and 2 HIV/leprosy patients compared to the healthy individuals (median: 5.8%;  $p<0.05$ ).

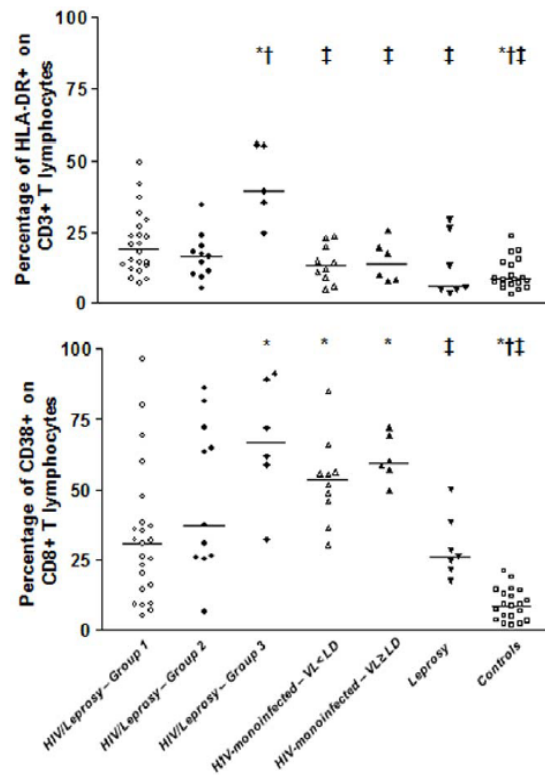
Similarly, differences were also observed in the circulation of CD8+ T cells expressing CD38 (Table 1, Figure 1). A high percentage of these cells was observed in group 2 HIV/leprosy patients (median: 66.7%) in contrast to the leprosy group and healthy controls (medians: 26.1% and 8.7%, respectively;  $p<0.01$ ). However, this expression was not significantly higher than that seen in the VL<LD and VL $\ge$ LD HIV-monoinfected groups (median: 53.3% and 59.3%, respectively). When the HIV/leprosy patients had their HIV viral load controlled, their activation status was reduced (group 1 median: 30.7%;  $p<0.05$ ), and this reduction was significant relative to that of the VL<LD and VL $\ge$ LD HIV-monoinfected patients. The activation levels in HIV/leprosy group 1 were significantly higher than those among the healthy controls ( $p<0.0001$ ), but not the leprosy patients.

**Analysis of the IRIS/RR phenomenon**

During the study, 9 of the 42 (21.4%) HIV/leprosy patients were identified as IRIS/RR by way of clinical status. Prior to the development of IRIS/RR symptoms, 7 were classified as BT while only 2 (patients Hs040 and Hs 045) were defined as BB.

All patients were under HAART during reaction although the time that lapsed between HAART submission and the onset of IRIS/RR varied from 3 months of treatment to 3 years post-treatment. Of interest, we were also able to quantify the CD4+ T cells and VL levels of 6 of the 9 IRIS/RR patients, previously to HAART submission. The CD4+ T cell absolute counts were under 350 cells/mm<sup>3</sup>, with a median value of 114 cells/mm<sup>3</sup> (range: 17–318 cells/mm<sup>3</sup>). At the same time, high levels of VL were obtained, ranging from 20,000 to 5,700,000 copies/ml (median: 148,600 copies/ml). These patients were highly immunocompromised at baseline accompanied by intense viral replication. However, at the time of IRIS/RR, VL was virtually undetectable in 7 of the HIV/leprosy patients, except for 2 who had 320 (Hs012) and 4,880 copies/ml (Hs043). Indeed, as expected, their immunological status was restored since all 9 patients presented incremented CD4+ T absolute counts (mediana: 408 cells/mm<sup>3</sup> (range: 140–767 cells/mm<sup>3</sup>).

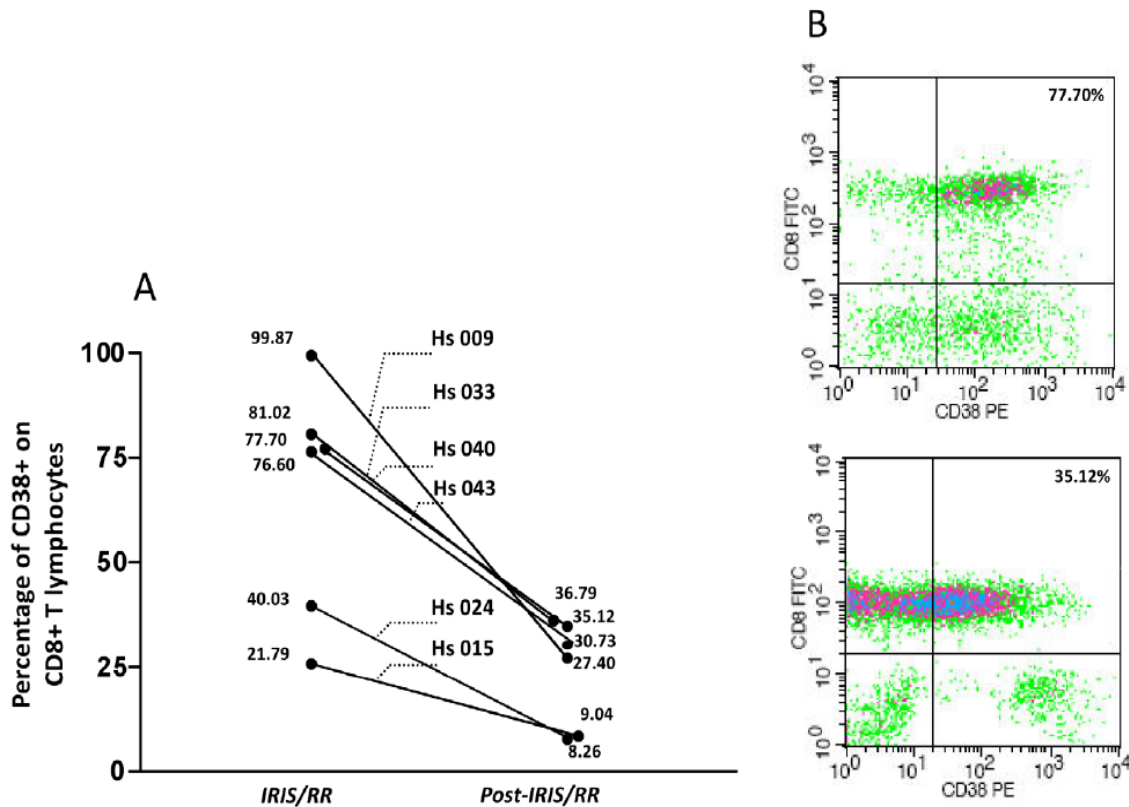
The other T cell immunological parameters were also evaluated in these 9 patients and although no clear pattern of expression was identified in terms of either cellular differentiation or activation



**Figure 1. The percentage of HLA-DR+ in CD3+ T lymphocytes (upper panel) and the percentage of CD38+ in CD8+ T lymphocytes (lower panel) in samples from HIV/leprosy patients from group 1 (VL<LD), group 2 (VL $\ge$ 80<10,000 copies/ml), and group 3 (VL $\ge$ 10,000 copies/ml); HIV-monoinfected VL<80 copies/ml and VL>80 copies/ml patients; leprosy-infected individuals; and healthy controls. Bars represent median values. \*  $p<0.05$  – Mann-Whitney U test for each group compared with HIV/leprosy patients from group 1; †  $p<0.05$  – Mann-Whitney U test for each group compared with HIV/leprosy patients from group 2; ‡  $p<0.05$  – Mann-Whitney U test for each group compared with HIV/leprosy patients from group 3. VL: HIV viral load. LD: Limit of detection. doi:10.1371/journal.pone.0028735.g001**

markers in comparison with the HIV/leprosy patients with no RR signals, the IRIS/RR patients had high cellular activation levels at the onset of IRIS/RR. We were able to monitor these patients at different time points, including the post-IRIS/RR resolution moment, and interesting results were observed.

Six patients were analyzed at the initiation of an IRIS/RR episode and after the completion of treatment with prednisone. Regarding the expression of CD38 in CD8+ T cells, 6 individuals showed high levels of cellular activation (median: 77.15%; CI: 37.66%–96.13%) at the onset of IRIS/RR (Figure 2A). These values dropped significantly ( $p<0.05$ ) post-IRIS/RR after 6 months of therapy with prednisone (median: 29.70%; CI: 11.17%–37.94%). Subsequent to prednisone treatment, cellular activation levels were significantly lower than those seen in the VL<LD HIV-monoinfected patients ( $p<0.01$ ), similar to those detected in the leprosy patients but higher than that observed among the healthy controls ( $p<0.05$ ). This reduction in CD38 expression in CD8+ T cells was clearly seen during flow cytometry analysis as observed by the cellular migration from the upper left panel to the upper right panel of the dot-plot graphics in Figure 2B.



**Figure 2. The percentage of CD38+ in CD8+ T lymphocytes obtained from HIV/leprosy-coinfected patients during the development of immune reconstitution inflammatory syndrome/reversal reaction (IRIS/RR) episodes and at the completion of reaction treatment with prednisone (Post-IRIS/RR) (Panel A). \*  $p < 0.05$  – Wilcoxon  $U$  test. Representative flow cytometry profile presented by one HIV/leprosy coinfected patient (Hs040), during an IRIS/RR episode (upper dot plot) and post-IRIS/RR (under dot plot) evaluated for the expression of CD38 in CD8+ T lymphocytes (Panel B).**

doi:10.1371/journal.pone.0028735.g002

After prednisone treatment, CD8+/CD38+ T circulating cell levels were higher in those HIV/leprosy patients who also had the highest activation levels during IRIS/RR, specifically individuals Hs009, Hs033, Hs040, and Hs043 (Fig. 2A), in comparison to the Hs015 and Hs024 patients, whose activation levels were lower at both time points.

Moreover, it is noteworthy that patient Hs009, who was also evaluated almost 4 months prior to the initiation of an IRIS/RR episode, already expressed CD38 in 59.82% of the circulating CD8+ T cells. Similarly, patient Hs019, analyzed just 5 days before the development of IRIS/RR symptoms, expressed CD38 in 77.02% of the CD8+ cells in contrast to the onset of IRIS/RR, when the percentage was 86.18%. Therefore, it can be assumed that an increase in these activated cells occurred prior to the IRIS/RR episodes.

Patient Hs012 was evaluated twice within a one-month period post-IRIS/RR. At the completion of prednisone therapy (post-IRIS/RR), 25.70% of the T cells were activated CD8+/CD38+ cells. However, one month later, this number had risen to 62.54%. This patient is still under surveillance; but, to date, no further IRIS/RR episodes have been detected.

## Discussion

Leprosy remains a significant global health problem, and over 40,000 new cases were registered in Brazil in 2009 [26]. Leprosy

and HIV are two chronic infectious diseases with an overlapping geographic distribution in Brazil. Nonetheless, valuable information regarding the impact of these two diseases on T cell phenotypes in infected individuals remains scarce.

Immunological interactions between leprosy and HIV have been a topic of great interest over the last two decades or so. While an increase in the immunosuppressive form of leprosy (LL) was expected to occur in HIV/leprosy coinfected patients, this was not confirmed by follow-up studies. In contrast, occurrences of the tuberculoid form of leprosy predominate among these coinfected individuals whatever the T lymphocyte count in the blood [27], [28]. This was also observed at the present study, where 61.9% of the 42 HIV/leprosy coinfected patients presented the BT form of leprosy, while only 13 of them were identified as multibacillary cases. In the same way and also in contrast to the initially expected for leprosy and HIV coinfection [29], we observed low frequency of neurological impairment among the HIV/leprosy patients.

The most interesting phenomenon associated with the interaction between HIV and leprosy infection is the higher incidence of reversal reactions (RR) [28], suggesting that the immune regulation of each disease is independent. The higher frequency of RR after initiating HAART has brought on new challenges to the full understanding of this immunological phenomenon, previously been thought to be an *M. leprae*-specific immune reactivation. In addition, many of the leprosy cases appearing after



the introduction of HAART with unusually inflammatory features have been classified as IRIS. We were able to identify 9 cases of IRIS/RR phenomenon among our HIV/leprosy coinfecting patients. These individuals presented the symptoms of leprosy reversal reaction, after the onset of antiretroviral therapy and were considered among the patients having HAART-related leprosy [25]. Considering the same IRIS criteria previously used by our group to define IRIS cases [13], 93 out of 9 IRIS/RR patients (Hs012, Hs024 and Hs043) can be really defined as IRIS cases, since they developed the symptoms during the first 6 months of HAART. However, others studies also identified IRIS cases at periods of longer than 10 months [30]. In this study, we aimed to characterize some of the key T cell phenotypes involved in the HIV/leprosy interaction in coinfecting vs. non-coinfecting patients and analyze some major features of the IRIS/RR phenomenon.

We first examined CD4+ T cell counts, the classic immunological parameter for HIV infection follow-up. All HIV/leprosy-coinfecting individuals showed a reduction in CD4+ cells, as expected for HIV-positive individuals, although the median values were similar or higher than those shown in other studies, regardless of viral load levels and/or HAART status [22], [23], [31]. An increase in absolute CD4+ T counts was observed in HIV/leprosy coinfecting patients with undetectable VL levels, reflecting the quantitative immune reconstitution that occurs as a consequence of viral replication control and antiretroviral therapy. Moreover, despite the presence of *M. leprae*, HIV/leprosy coinfection exhibited the same CD4+ T cell behavior observed in HIV-infected patients in the absence of detectable VL under HAART, consistent with previous studies [23], [24], [31].

The lower levels of CD3+CD8+ T cells observed in groups 1 and 2 HIV/leprosy patients could be also attributed to a more effective control of viremia in these as opposed to the VL>LD HIV-monoinfected individuals. These data do not agree with the more severe immunopathology for HIV/leprosy coinfecting individuals, previously suggested by Carvalho et al [31], probably due our analysis in terms of different viral load levels. On the other hand, even with a controlled viral load, when the group 1 was compared with the leprosy patients and healthy controls a higher percentage of CD8+ T cells was found. This data would suggest the effect of residual viremia on the immune system, undetectable by the currently methodology.

It is important to note that peripheral blood CD4+ or CD8+ T cell counts do not necessarily reflect either the number or function of these T cells at the actual sites of coinfection, although the evaluation of skin lymphocytic infiltrate in HIV/leprosy coinfecting patients demonstrated the predominant involvement of CD8+ T cells at the site of disease, in granuloma formation, being more frequent than CD4+ T cells [32].

The CD4+ T cells that express the cell-surface isoforms CD45RA and CD45RO are major targets in HIV infection [33]. We evaluated the expression of these molecules by CD4+ and CD8+ circulating T cells, in order to define a cellular differentiation profile, but low differences were observed among the studied groups and we were not able to identify any defined profile. So, this was an important limitation of the present study, since in order to well define the differentiation pathway for T cells, many others surface molecules should be investigated [34], [35]. So, these differentiation profiles are currently being investigated in more detail by our team to better understand naïve cell behavior, central and effector memory cells, and other intermediary T cell fractions in HIV/leprosy coinfection scenario.

The evaluation of the activation parameters showed high frequencies of HLA-DR expression in CD3+ T cells and CD38+ expression in CD8+ T cells in HIV/leprosy-coinfecting individuals,

as was previously observed by the present authors in Leishmania/HIV-coinfecting patients [24]. The HLA-DR molecule is capable of presenting antigenic peptides to the CD4+ T cell receptor complex and CD38 may function as an adhesion molecule. During HIV infection, changes in the expression of these markers are associated with immune dysfunction and disease progression. In our study, these expression frequencies, especially CD38 on CD8+ T cells, appeared to be associated with viral load because group 3 HIV/leprosy individuals showed the highest activation profile. However, frequent expression of these markers in the undetectable viral load group was also detected. Previous reports have shown that low levels of viral production have been known to persist in patients regardless of their being under long-term, effective HAART and that this remaining viremia could have an important impact on the immune system of some patients undergoing continuous, effective HAART [36]. Other studies have also suggested that even those patients with HAART-mediated viral load suppression show a high percentage of activated T cells and that this immune activation might be determined by immunological memory cells [37]. Our observation that T cell activation markers increased in HIV/leprosy cases despite low or undetectable HIV RNA levels might also be explained by the fact that immune activation could be determined by *M. leprae* in addition to HIV RNA levels. How the two pathogens act synergistically to drive immune activation remains to be fully elucidated.

The pathogenesis of IRIS in leprosy has not yet been clearly defined, but the re-establishment of CD4+ and CD8+ T lymphocytes after HAART may explain their development. Previous studies have shown that cellular responses to some mycobacterial diseases, such as *M. avium* complex infection, can be restored after 2 weeks of HAART in HIV1-infected patients [38]. HIV/tuberculosis patients also show inflammatory episodes characterized as IRIS after the initiation of HAART [39]. The increase in CD8+ T cell counts after HAART, independent of the CD4+ T cell count, may be an explanation for some of these reactions. Previous studies have demonstrated that the CD8+ T cell count was a risk factor associated with the development of herpes zoster after initiation of HAART [40]. Other authors have proposed that the increase in CD8+ T cells after HAART may result in clinical hepatitis caused by HBV as well as HCV [41,42].

Increases in the expression of activation markers in effector CD8+ T cell populations may also provide insight into the immunopathogenesis of IRIS. Effector CD8+ T cells exhibit specialized functions such as cytotoxicity, antiviral cytokine production, telomerase activity, and the production of cytokines such as IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF, perforin, and granzymes. Of these, IFN- $\gamma$  is known to increase in response to mycobacterial antigens in patients who developed tuberculosis/IRIS [37]. Once these cells are distributed in the periphery, they take on an immediate effector function and, thus, may be able to promote a rapid, but unsustainable, response to peripheral antigens.

Interestingly, the CD38 antigen, a cellular activation marker previously associated with HIV pathogenesis [43], was significantly elevated in the CD8+ T cells of IRIS/RR individuals in our study but diminished after prednisone therapy. Of the 9 HIV/leprosy patients identified as experiencing IRIS/RR, 6 had been found to fit this profile, and 2 were obviously undergoing IRIS at the time of reaction. The percentage of CD8+/CD38+ T cells increased prior to the initial onset of IRIS/RR symptoms. These data open a promising channel of investigation into CD38 expression, which could be a useful biomarker for identifying coinfecting individuals with activated immune systems at risk of developing IRIS/RR. Obviously, the evaluation of the leprosy

individuals under reversal reaction need to be conducted, in order to investigate if the CD38 expression on CD8+ T cells will follow the same profile.

In summary, leprosy and HIV lead to some similar and some distinct immune alterations. In HIV-monoinfected and HIV/leprosy coinfecting individuals with high viremia, CD4+ T cell depletion together with pronounced T cell activation may be involved in a generalized hyporesponsiveness of the immune system. In coinfecting subjects, HIV apparently controls the overall immunological scenario, especially in patients with low CD4+ T counts. HIV and leprosy seem to have no additive effects in that each infection causes specific immune changes, which do not appear to contribute to the synergistically unfavorable effects of coinfection.

Our findings regarding IRIS/RR individuals may prove useful in designing future studies aimed at identifying patients at risk of

developing IRIS/RR. Future prospective pathogen-specific IRIS immunological studies will likely be required to increase our understanding of its pathogenesis and to identify potential biomarkers for the disease.

## Acknowledgments

We would especially like to thank all our patients who agreed to participate in the study. We are also indebted to Giselle Furtado Borges for her technical support in T lymphocyte subpopulation counts.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CG-G AMS JAN ES MM. Performed the experiments: CG-G. Analyzed the data: CG-G ES MM. Contributed reagents/materials/analysis tools: CG-G JS-O. Wrote the paper: CG-G AdO.

## References

- Hogg RS, O'Shaughnessy MV, Gataric N, Yip B, Craib K, et al. (1997) Decline in deaths from AIDS due to new antiretrovirals. *Lancet* 349: 1294.
- Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, et al. (1998) Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338: 853–860.
- Jehle AW, Khanna N, Sigle JP, Glatz-Krieger K, Battegay M, et al. (2004) Acute renal failure on immune reconstitution in an HIV-positive patient with miliary tuberculosis. *Clin Infect Dis* 38: e32–35.
- Race EM, Adelson-Mitty J, Krieger GR, Barlam TF, Reimann KA, et al. (1998) Focal mycobacterial lymphadenitis following initiation of protease-inhibitor therapy in patients with advanced HIV-1 disease. *Lancet* 351: 252–255.
- Koval CE, Gigliotti F, Nevins D, Demeter LM (2002) Immune reconstitution syndrome after successful treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a man with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Infect Dis* 35: 491–493.
- Shelburne SA, 3rd, Hamill RJ, Rodriguez-Barradas MC, Greenberg SB, Atmar RL, et al. (2002) Immune reconstitution inflammatory syndrome: emergence of a unique syndrome during highly active antiretroviral therapy. *Medicine (Baltimore)* 81: 213–227.
- Murdoch DM, Venter WD, Van Rie A, Feldman C (2007) Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS): review of common infectious manifestations and treatment options. *AIDS Res Ther* 4: 9.
- Cheng VC, Ho PL, Lee RA, Chan KS, Chan KK, et al. (2002) Clinical spectrum of paradoxical deterioration during antituberculosis therapy in non-HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21: 803–809.
- Lawn SD, Wood C, Lockwood DN (2003) Borderline tuberculoid leprosy: an immune reconstitution phenomenon in a human immunodeficiency virus-infected person. *Clin Infect Dis* 36(suppl): e5–e6.
- Gouppie P, Abel S, Voinchet H, Roussel M, Helenon R, et al. (2004) Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with HIV and leprosy. *Arch Dermatol* 140: 997–1000.
- Visco-Comandini U, Longo B, Cuzzi T, Paglia MG, Antonucci G (2004) Tuberculoid leprosy in a patient with AIDS: A manifestation of immune restoration syndrome. *Scand J Infect Dis* 36: 881–883.
- Pignataro P, Rocha Ada S, Nery JA, Miranda A, Sales AM, et al. (2004) Leprosy and AIDS: Two cases of increasing inflammatory reactions at the start of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 408–411.
- Menezes VM, Sales AM, Illarramendi X, Miranda A, Gonçalves Morgado M, et al. (2009) Leprosy reaction as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome: a case series of a Brazilian cohort. *AIDS* 23: 641–643.
- Kharkar V, Bhor UH, Mahajan S, Khopkar U (2007) Type I lepra reaction presenting as immune reconstitution inflammatory syndrome. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 73: 253–256.
- Sasaki S, Takeshita F, Okuda K, Ishii N (2001) *Mycobacterium leprae* and leprosy: a compendium. *Microbiol Immunol* 45: 729–36.
- Scollard DM, Smith T, Bhoopat L, Theetranont C, Rangdaeng S, et al. (1994) Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 62: 559–567.
- French MA, Lenzon N, John M, Mallal SA, McKinnon EJ, et al. (2000) Immune restoration disease after the treatment of immunodeficient HIV-infected patients with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med* 1: 107–115.
- Jevtic DJ, Salemovic D, Ranin J, Pesic I, Zerjav S, et al. (2005) The prevalence and risk of immune restoration disease in HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med* 6: 140–143.
- Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, et al. (1997) Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 277: 112–116.
- Kaushik S, Vajpayee M, Sreenivas V, Seth P (2006) Correlation of T-lymphocyte subpopulations with immunological markers in HIV-1-infected Indian patients. *Clin Immunol* 119: 330–338.
- Benito JM, Lopez M, Lozano S, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, et al. (2004) CD38 expression on CD8(+) T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *Aids Research and Human Retroviruses* 20: 227–233.
- Benito DM, Lopez M, Lozano S, Ballesteros C, Martinez P, et al. (2005) Differential upregulation of CD38 on different T-cell subsets may influence the ability to reconstitute CD4(+) T cells under successful highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 38: 373–381.
- Appay V, Sauce D (2008) Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* 214: 231–241.
- Santos-Oliveira JR, Giacoina-Gripp CBW, Oliveira PA, Sabagga-Amato V, Lindoso JA, et al. (2010) High levels of T lymphocytes activation are observed in *Leishmania*-HIV-1 co-infected despite low HIV viral load. *BMC Infect Dis* 10: 358.
- Talhari C, Mira MT, Massone C, Braga A, Chrusciak-Talhari A, et al. (2010) Leprosy and HIV coinfection: a clinical, pathological, immunological, and therapeutic study of a cohort from a Brazilian referral center for infectious diseases. *J Infect Dis* 202: 345–354.
- Portal da Saúde website. Available: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/graf\\_1\\_n\\_percentual\\_casos\\_hanse\\_2009\\_01\\_12.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/graf_1_n_percentual_casos_hanse_2009_01_12.pdf). Accessed 2011 Feb 1.
- Sampaio EP, Caneshi JR, Nery JA, Duppre NC, Pereira GM, et al. (1995) Cellular immune response to *Mycobacterium leprae* infection in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Infect Immun* 63: 1848–1854.
- Sarno EN, Illarramendi X, Nery JAC, Sales AM, Gutierrez-Galhardo MC, et al. (2008) HIV-M. leprae interaction: can HAART modify the course of leprosy? *Public Health Rep* 123: 206–212.
- Lockwood DN, Lambert SM (2011) Human immunodeficiency virus and leprosy: an update. *Dermatol Clin* 29: 125–128.
- Massone C, Talhari C, Ribeiro-Rodrigues R, Sindeaux RH, Mira MT, et al. (2011) Leprosy and HIV coinfection: a critical approach. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9: 701–710.
- Carvalho KI, Maeda S, Marti I, Yamashita J, Haslett PA, et al. (2008) Immune cellular parameters of leprosy and human immunodeficiency virus-1 co-infected subjects. *Immunology* 124: 206–214.
- Massone C, Talhari C, Talhari S, Brunasso AM, Campbell TM, et al. (2008) Immunophenotype of skin lymphocytic infiltrate in patients co-infected with *Mycobacterium leprae* and human immunodeficiency virus: a scenario dependent on CD8+ and/or CD20+ cells. *Br J Dermatol* 165: 321–328.
- Woods TC, Roberts BD, Butera ST, Folks TM (1997) Loss of inducible virus in CD45RA naive cells after human immunodeficiency virus-1 entry accounts for preferential viral replication in CD45RO memory cells. *Blood* 89: 1635–1641.
- Decrin AZ, Varin A, Drobacheff C, Estavoyer JM, Herbein G (2007) A subset of functional effector-memory CD8+ t lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected patients. *Immunology* 121: 405–415.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22: 745–763.
- Havtirik DV, Strain MC, Clerici M, Ignacio C, Trabattini D, et al. (2003) Productive infection maintains a dynamic steady state of residual viremia in human immunodeficiency virus type 1-infected persons treated with suppressive antiretroviral therapy for five years. *J Virol* 77: 11212–11219.
- Marziali M, De Santis W, Carello R, Leti W, Esposito A, et al. (2006) T-cell homeostasis alteration in HIV-1 infected subjects with low CD4 T-cell count despite undetectable virus load during HAART. *AIDS* 20: 2033–2041.

38. Bourgarit A, Carcelain G, Martinez V, Lascoux C, Delcey V, et al. (2006) Explosion of tuberculin-specific Th1-responses induces immune restoration syndrome in tuberculosis and HIV co-infected patients. *AIDS* 20: F1–7.
39. Schluger NW, Perez D, Liu YM (2002) Reconstitution of immune responses to tuberculosis in patients with HIV infection who receive antiretroviral therapy. *Chest* 122: 597–602.
40. Martinez E, Gatell J, Moran Y (2008) High incidence of herpes zoster in patients with AIDS soon after therapy with protease inhibitors. *Clin Infect Dis* 27: 1510–1513.
41. Carr A, Cooper DA (1997) Restoration of immunity to chronic hepatitis B infection in HIV-infected patient on protease inhibitor. *Lancet* 349: 995–996.
42. Rutschmann OT, Negro F, Hirschel B, Hadengue A, Anwar D, et al. (1998) Impact of treatment with human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitors on hepatitis C viremia in patients coinfecting with HIV. *J Infect Dis* 177: 783–785.
43. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, et al. (1997) Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 16: 83–92.



### **Anexo 3**

#### **Artigo (publicado)**

**Título:** Lipopolysaccharide-induced cellular activation may participate in the immunopathogenesis of visceral leishmaniasis alone or in HIV co-infection.

**Autores:** Joanna Reis Santos-Oliveira e Alda Maria Da-Cruz

International Journal of Microbiology 2012, article ID364534.

#### **RESUMO**

A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa que representa um sério problema de saúde pública, integrando a lista de doenças tropicais negligenciadas. A doença é caracterizada por uma supressão imune específica ao parasito, depleção de células T e uma diminuição de outras células hematopoiéticas. Em paralelo, uma reposta imunoestimulatória também ocorre, representada pelos linfócitos B policlonais, ativação de células T e respostas pró-inflamatórias. Antígenos parasitários parecem estar envolvidos em ambos os mecanismos, supressão e ativação, mas estes conceitos estão sendo revisados. Similarmente aos relatos em HIV/AIDS, nós propusemos que o parasitismo intestinal por amastigotas de *Leishmania* e a depleção linfocitária também poderia afetar o tecido linfoide associado à mucosa, resultando em um dano na barreira intestinal, favorecendo assim, a translocação microbiana. Um incremento dos níveis de LPS plasmáticos foi implicado nas contagens reduzidas de células T CD4+ e T CD8+, na ativação de células T sistêmica, nos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias e nos maiores níveis de MIF, sugerindo que uma molécula bacteriana não associada à infecção por *Leishmania* pode exercer efeitos deletérios sobre o sistema imune. Resultados recentes também apontaram que a resposta pró-inflamatória estava potencializada em pacientes coinfectados LV/HIV-1. A ativação celular mediada pelo LPS adiciona outro conceito à imunopatogênese da LV e pode trazer uma justificativa para novas intervenções terapêuticas que poderiam melhorar a conduta clínica desses pacientes.



## Review Article

# Lipopolysaccharide-Induced Cellular Activation May Participate in the Immunopathogenesis of Visceral Leishmaniasis Alone or in HIV Coinfection

Joanna Reis Santos-Oliveira<sup>1</sup> and Alda Maria Da-Cruz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Disciplina de Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, UERJ, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Alda Maria Da-Cruz, alda@ioc.fiocruz.br

Received 11 June 2012; Accepted 29 July 2012

Academic Editor: Giancarlo Ceccarelli

Copyright © 2012 J. R. Santos-Oliveira and A. M. Da-Cruz. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Visceral Leishmaniasis (VL) is an infectious disease which constitutes a serious public health problem, integrating the list of neglected tropical diseases. The disease is characterized by a *Leishmania*-specific immune suppression T-cell depletion and a decrease of other hematopoietic cells. In parallel, an immunostimulatory response also occurs, represented by polyclonal B lymphocytes, T-cell activation, and systemic proinflammatory responses. Parasite antigens were believed to mediate both suppression and activation mechanisms, but these concepts are constantly being revised. Similar to reports on HIV/AIDS, we have proposed that gut parasitization by amastigotes and lymphocyte depletion could also affect gut-associated lymphoid tissue, leading to mucosal barrier breach and predisposing to microbial translocation. An increment of plasmatic lipopolysaccharide (LPS) levels observed in Brazilian VL patients was implicated in the reduced blood CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts, systemic T-cell activation, pro-inflammatory cytokines and MIF plasma levels, suggesting that a bacterial molecule not associated with *Leishmania* infection can exert deleterious effects on immune system. Recent results also pointed that the proinflammatory response was potentiated in VL/HIV-AIDS coinfecting patients. The LPS-mediated cell activation adds another concept to the immunopathogenesis of VL and can bring a rationale for new therapeutic interventions that could ameliorate the management of these patients.

Visceral leishmaniasis (VL) is an infectious disease caused by protozoans of *Leishmania* sp. genus. VL is a serious public health problem integrating the list of neglected tropical diseases. In a recent World Health Organization report, 0.2 to 0.4 million cases were globally estimated in the last five years [1]. Ninety percent of them occur in only six countries: India, Bangladesh, Sudan, South Sudan, Brazil, and Ethiopia [1, 2]. The infection is transmitted by sandflies, and nowadays, *L. (Leishmania) donovani* and *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) are the main species causing VL [3]. These protozoans are intracellular obligate parasites that infect macrophage cell lineages from lymphoid organs such as bone marrow, spleen, liver, and lymph nodes. VL is classically characterized by fever, hepatosplenomegaly, cachexia, blood cytopenia, and a high parasite burden [4, 5]. It has a high mortality rate, and even in treated patients, the case fatality rates are

of 10–20% [1], especially in HIV-coinfecting patients [6]. Immunological response is directly involved in the disease's clinical outcome, but the pathogenic mechanisms are still controversial, and the concepts are constantly being revised [7–11].

VL is classically considered an immune suppression-mediated disease characterized by T-cell depletion and decrease of other hematopoietic cells (erythrocytes, platelets, and neutrophils) [4]. Early studies from the 80s showed that active phase of VL evolves with an impairment of the specific effector T-cell response to leishmanial antigens, absence of a delayed-type hypersensitivity reaction to parasite antigens, and an inability of T lymphocytes to proliferate and produce interferon (IFN)- $\gamma$  and interleukin (IL)-2 cytokine in response to leishmanial antigens [4, 12]. *In vitro* neutralization of IL-10 and IL-4 recovers the type

1 cytokine production in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with leishmanial antigens [13]. In accordance with this, restoration of the immune response to *L. infantum* is also achieved following specific treatment [13, 14] which reinforced the role of parasite antigens in the suppressive mechanisms [15]. However, other mechanisms have already been implicated in this immunodeficiency such as: circulating molecules acting as soluble receptors for IL-2 [16], immunocomplexes, lipoproteins [17], and deactivating cytokine interactions (IL-4, IL-10, and transforming growth factor [TGF]- $\beta$ ) [15]. These suppressive mechanisms are aggravated by the intense leucopenia especially on T-cell compartment, with a consequent decrease of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes [9].

Although immunosuppression is considered a hallmark of acute VL, a remarkable polyclonal B-cell response also occurs. High titers of unspecific and specific immunoglobulins against leishmanial antigens were described [4], suggesting a dual role to parasite antigens, either lymphocytes' activation or inhibition. Therefore, others studies reported an intense release of inflammatory cytokines in the plasma of active VL patients, including tumour necrosis factor (TNF) [18], IL-6, IL-8, and macrophage migration inhibitory factor (MIF) [9, 10]. Besides, elevated levels of plasmatic IL-10 and TGF- $\beta$  are also detected, showing that these patients present a mixed profile as a result of a cytokine storm [9, 19]. By consequence, VL patients clinically present as systemic inflammatory response syndrome [5] similar to sepsis, malaria, or dengue fever.

A systemic proinflammatory response is also observed in HIV-1/AIDS patients [20]. As the virus-mediated chronic immune stimulation does not fully explain the intense cellular activation, other mechanisms have been investigated. Of utmost impact, it was demonstrated that CD4<sup>+</sup> T cell depletion from gut-associated lymphoid tissue (GALT) [21] leads to mucosal barrier breach and predisposing to microbial translocation (MT). Bacterial products as lipopolysaccharide (LPS) were responsible for an intense cellular activation and proinflammatory cytokine release due to its immunostimulatory activity [22].

Recently, Brenchley and Douek [23] reviewed all the restrictions that humans developed to protect themselves from intestinal microbiota translocation. In this context, any alteration in the gut selective permeability or loss of intestinal immune regulation can facilitate the MT. This phenomenon has been demonstrated in diseases involving the intestinal tract such as inflammatory bowel diseases [24] and graft-versus-host disease [25]. Taking into account that gut parasitization by *Leishmania* amastigotes is known to occur in VL [26, 27], it was also expected that a microbial leakage from gut into the circulation was likely to affect these patients. Moreover, VL shares similar pathogenic features to HIV/AIDS, most notably proinflammatory responses and systemic lymphocyte depletion [4]. Recently, our group demonstrated that the increment of plasmatic LPS levels observed in Brazilian VL patients was implicated in the reduced blood CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell counts, systemic T-cell activation, proinflammatory cytokine plasma levels, and higher MIF levels, suggesting that a bacterial molecule not

associated with *Leishmania* infection can exert deleterious effects on immune system [9]. LPS levels are correlated to soluble CD14 (sCD14) and plasma intestinal fatty acid binding protein (IFABP) levels in VL patients. It implies that LPS was bioactive *in vivo*, probably having a luminal origin. An increase in activated status was shaped by increased percentages of activation-associated molecules (HLA-DR, CD38, and CD25) on T lymphocytes and high proinflammatory cytokines response. Consistent with this feature, LPS levels were positively correlated with IL-6, IL-8, and MIF. The hypothesis that bacterial products can impact on chronic immune hyperactivation status in VL prompted us to argue possible benefits of antimicrobial prophylaxis in conjunction with anti-*Leishmania* therapy. Thus, ongoing studies in experimental VL are being performed.

Studies addressing MT in infectious diseases are scarce. To our knowledge, rather than HIV-1 infection [23] and VL [9], a LPS-induced immunostimulatory role was only demonstrated in HBV and HCV virus [28]. A spectrum of changes in the mucosal architecture can be observed in giardiasis, with consequent diarrhea episodes and adherence to the epithelium [29], raising the issue that any condition that causes gastrointestinal barrier damage may allow luminal contents leakage into circulation. In this context, intestinal parasitic disease such as amebiasis, strongyloidiasis, or cryptosporidiasis, as well as gastroenteritis due to virus or bacteria could evolve with MT. These possibilities raise such pathogens, as candidates to further studies.

In the last 30 years, the expansion of the HIV/AIDS epidemic over leishmaniasis endemic areas and vice versa has increased the number of coinfecting patients [6]. VL is an opportunistic disease in HIV/AIDS patients, although not yet considered an AIDS-defining disease. Both infections with *L. infantum* and HIV-1 share immune-compromising mechanisms that may affect the parasite control in VL coinfecting patients [30]. Consequently, coinfecting patients present a more severe disease in comparison to patients with VL alone, with increased parasite burden, drug resistance, and frequent relapses [6, 31]. On the other hand, *Leishmania* infection can also contribute to more rapid progression to AIDS, impairing both the lymphocyte depletion and the chronic immune activation, disturbances already observed in HIV-1-infected patients [32, 33].

Considering that MT is involved in activation mechanisms in HIV/AIDS patients and was also detected in VL, it was supposed that this phenomenon could be potentiated in coinfecting patients. Recent studies (Santos-Oliveira et al., paper in preparation) showed that *Leishmania*/HIV-coinfecting and HIV-1 monoinfected patients presented high LPS and IFABP levels, but the results were not statistically different. However, the plasma proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17, IFN- $\gamma$ , and TNF) were much more higher in coinfecting group. LPS levels along with immune consequences of *Leishmania* infection were associated with high levels of CD38 in T CD8<sup>+</sup> in coinfecting patients. These cofactors seem to contribute to the activation status by enhancing the plasma cytokine storm. The parasite influence in this system cannot be ruled out, although patients had

experienced a clinical remission of VL symptoms after antileishmanial therapy.

In conclusion, the parasitization of intestinal mucosa and T-cell depletion can lead to GALT compromising, enabling microbial translocation of luminal gram-negative bacteria in VL. The LPS-mediated cell activation adds another concept to the immunopathogenesis of the complex viscerotropic *Leishmania*-host interaction. More importantly, immune activation can profoundly impact the VL clinical course and prognosis, contributing to increase the risk of death even under antileishmanial treatment. This mechanism is aggravated in *Leishmania*/HIV coinfecting patients. These findings can bring a rationale for new therapeutic interventions that could ameliorate the management of these patients, thus reducing the mortality of VL associated or not with HIV-1 infection.

### Acknowledgments

The authors are very grateful to all collaborators from Rede Brasileira de Co-infecção *Leishmania*-HIV for supporting patients recruitment, discussions, and helpful advice. They also thank C. Vorsatz for kindly reviewing the final English text. They thank the following funding agencies for support of their work: Instituto Oswaldo Cruz (internal funds), Programa Nacional de DST/AIDS, Ministério da Saúde/Brasil (Grant ED00095/2007), and CNPq. J. R. Santos Oliveira is a fellow of FAPERJ (FAPERJ Nota 10). A. M. Da Cruz is a research fellow from CNPq and FAPERJ (JCNE).

### References

- [1] J. Alvar, I. Vélez, C. Bern et al., "Leishmaniasis worldwide and global estimates of this prevalence," *Plos One*, vol. 7, no. 5, Article ID e35671, 2012.
- [2] A. N. S. Maia-Elkhoury, E. H. Carmo, M. L. Sousa-Gomes, and E. Mota, "Analysis of visceral leishmaniasis reports by the capture-recapture method," *Revista de Saúde Pública*, vol. 41, no. 6, pp. 931–937, 2007.
- [3] K. Kuhls, M. Z. Alam, E. Cupolillo et al., "Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 6, Article ID e1155, 2011.
- [4] S. Saha, S. Mondal, A. Banerjee, J. Ghose, S. Bhowmick, and N. Ali, "Immune responses in kala-azar," *Indian Journal of Medical Research*, vol. 123, no. 3, pp. 245–266, 2006.
- [5] C. H. N. Costa, G. L. Werneck, D. L. Costa et al., "Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 43, no. 4, pp. 386–392, 2010.
- [6] J. Alvar, P. Aparicio, A. Aseffa et al., "The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 21, no. 2, pp. 334–359, 2008.
- [7] E. M. Carvalho, R. S. Teixeira, and W. D. Johnson, "Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection," *Infection and Immunity*, vol. 33, no. 2, pp. 498–502, 1981.
- [8] C. L. Karp, S. H. El-Safi, T. A. Wynn et al., "In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 91, no. 4, pp. 1644–1648, 1993.
- [9] V. Peruhype-Magalhães, O. A. Martins-Filho, A. Prata et al., "Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- $\alpha$ <sup>+</sup> monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 146, no. 1, pp. 124–132, 2006.
- [10] J. R. Santos-Oliveira, E. G. Regis, C. R. B. Leal, R. V. Cunha, P. T. Bozza, and A. M. Da-Cruz, "Evidence that lipopolysaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 7, Article ID e1198, 2011.
- [11] O. P. Singh, K. Gidwani, R. Kumar et al., "Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood," *Clinical Vaccine Immunology*, vol. 19, no. 6, pp. 961–966, 2012.
- [12] E. M. Carvalho, O. Bacellar, A. Barral, R. Badaro, and W. D. Johnson, "Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 83, no. 3, pp. 860–864, 1989.
- [13] E. M. Carvalho, O. Bacellar, C. Brownell, T. Regis, R. L. Coffman, and S. G. Reed, "Restoration of IFN- $\gamma$  production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis," *Journal of Immunology*, vol. 152, no. 12, pp. 5949–5956, 1994.
- [14] A. Caldas, C. Favali, D. Aquino et al., "Balance of IL-10 and interferon- $\gamma$  plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis," *BMC Infectious Diseases*, vol. 5, pp. 113–121, 2005.
- [15] H. Goto and M. D. G. Prianti, "Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 51, no. 5, pp. 241–246, 2009.
- [16] M. Barral-Netto, A. Barral, S. B. Santos et al., "Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis," *Journal of Immunology*, vol. 147, no. 1, pp. 281–284, 1991.
- [17] N. M. Soares, T. P. L. Ferraz, E. G. Nascimento, E. M. Carvalho, and L. Pontes-de-Carvalho, "The major circulating immunosuppressive activity in American visceral leishmaniasis patients is associated with a high-molecular weight fraction and is not mediated by IgG, IgG immune complexes or lipoproteins," *Microbial Pathogenesis*, vol. 40, no. 6, pp. 254–260, 2006.
- [18] M. Barral-Netto, R. Badaro, A. Barral et al., "Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 163, no. 4, pp. 853–857, 1991.
- [19] S. Nylén, R. Maurya, L. Eidsmo, K. Das Manandhar, S. Sundar, and D. Sacks, "Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 4, pp. 805–817, 2007.
- [20] D. C. Douek, M. Roederer, and R. A. Koup, "Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS," *Annual Review of Medicine*, vol. 60, pp. 471–484, 2009.
- [21] J. M. Brenchley, T. W. Schacker, L. E. Ruff et al., "CD4<sup>+</sup> T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 200, no. 6, pp. 749–759, 2004.
- [22] J. M. Brenchley, D. A. Price, T. W. Schacker et al., "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection," *Nature Medicine*, vol. 12, no. 12, pp. 1365–1371, 2006.



- [23] J. M. Brenchley and D. C. Douek, "Microbial translocation across the GI tract," *Annual Reviews of Immunology*, vol. 30, pp. 149–173, 2012.
- [24] O. J. Harrison and K. J. Maloy, "Innate immune activation in intestinal homeostasis," *Journal of Innate Immunology*, vol. 3, no. 6, pp. 585–593, 2011.
- [25] K. R. Cooke, K. Olkiewicz, N. Erickson, and J. L. M. Ferrara, "The role of endotoxin and the innate immune response in the pathophysiology of acute graft versus host disease," *Journal of Endotoxin Research*, vol. 8, no. 6, pp. 440–448, 2002.
- [26] C. S. Baba, G. K. Makharia, P. Mathur, R. Ray, S. D. Gupta, and J. C. Samantaray, "Chronic diarrhea and malabsorption caused by *Leishmania donovani*," *Indian Journal of Gastroenterology*, vol. 25, no. 6, pp. 309–310, 2006.
- [27] K. G. Luz, F. F. Tuon, M. I. S. Duarte et al., "Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 43, no. 4, pp. 393–395, 2010.
- [28] N. G. Sandler, C. Koh, A. Roque et al., "Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection," *Gastroenterology*, vol. 141, no. 4, pp. 1220–1230, 2010.
- [29] N. Müller and N. Von Allmen, "Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections," *International Journal for Parasitology*, vol. 35, no. 13, pp. 1339–1347, 2005.
- [30] V. Barreto-De-Souza, G. J. Pacheco, A. R. Silva et al., "Increased *Leishmania replication* in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E 2 synthesis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 194, no. 6, pp. 846–854, 2006.
- [31] G. F. Cota, M. R. de Sousa, and A. Rabello, "Predictors of visceral leishmaniasis relapse in hiv-infected patients: a systematic review," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 6, Article ID e1153, 2011.
- [32] J. R. Santos-Oliveira, C. B. W. Giacoia-Gripp, P. Alexandrino de Oliveira et al., "High levels of T lymphocyte activation in *Leishmania-HIV-1* coinfecting individuals despite low HIV viral load," *BMC Infectious Diseases*, vol. 10, pp. 358–363, 2010.
- [33] P. Alexandrino-de-Oliveira, J. R. Santos-Oliveira, M. E. C. Dorval et al., "HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 105, no. 5, pp. 692–697, 2010.

## Anexo 4

### Artigo (aceito para a publicação)

**Título:** “Enhanced T cell activation is observed in *Plasmodium falciparum* malaria infected HIV-1 patients from Mozambique”

**Autores:** Helena Chavale, Joanna Reis Santos-Oliveira, Alda Maria Da-Cruz, Sonia Enosse

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2012;

A infecção pelo HIV-1 causa um importante impacto na malária. Os pacientes coinfectados com *Plasmodium falciparum* e HIV-1 apresentam um alto grau de anemia, aumentada parasitemia e diminuídas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, estando sob alto risco de desenvolverem malária grave. Além disso, a infecção por *P.falciparum* e HIV-1 isoladamente causa intensa ativação imune. Então, nossa hipótese foi que a ativação linfocitária estivesse potencializada em pacientes coinfectados Pf/HIV, consequentemente prejudicando o estado de imunossupressão desses pacientes. Para isso, 22 pacientes Pf/HIV, 34 casos de malária, 29 de HIV/AIDS e 10 controles sadios sem malária e HIV provenientes de Moçambique foram recrutados. Como esperado, a anemia foi mais prevalente no grupo coinfectado. Uma grande variação na densidade parasitária foi observada em pacientes Pf/HIV (110 – 75.000 parasitas/ $\mu$ l), embora os valores medianos foram similares aos pacientes apenas com malária. As contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram significativamente menores nos pacientes coinfectados quando comparado aos pacientes de malária e aos casos de HIV/AIDS. A ativação de linfócitos foi avaliada pelo percentual de moléculas associadas à ativação (CD38<sup>+</sup> em T CD8<sup>+</sup> e HLA-DR<sup>+</sup> em T CD3<sup>+</sup>). O percentual mais elevado de células CD38<sup>+</sup> foi detectado nos pacientes coinfectados (mediana = 78,2%). Os pacientes apenas com malária (mediana = 50%) e os casos de HIV/AIDS (mediana = 52%) também apresentaram níveis elevados dessas moléculas, porém os valores foram inferiores aos dos pacientes coinfectados. Nossos dados sugerem que a ativação crônica de células T observada nos pacientes coinfectados pode agravar a resposta imune a ambas as doenças.

Running title: Activation in malaria/HIV co-infection.

Title: “Enhanced T cell activation is observed in *Plasmodium falciparum* malaria infected HIV-1 patients from Mozambique”

Author’s name:

Helena Chavale<sup>1,2</sup>, Joanna Reis Santos-Oliveira<sup>3</sup>, Alda Maria Da-Cruz<sup>3</sup>, Sonia Enosse<sup>1,2+</sup>

Institutional affiliations:

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Maputo, Mozambique

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Central de Maputo, Mozambique

<sup>3</sup> Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Ministério de Saúde, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

+Corresponding authors:

Sonia Enosse – Instituto Nacional de Saúde, Maputo, Moçambique. CEP 79070-900 Phone number: 00 258 21 431103, E-mail: [enosse.sonia@gmail.com](mailto:enosse.sonia@gmail.com)

Alda Maria Da-Cruz, Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMed), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365. Pav. Cardoso Fontes, 1<sup>o</sup> andar, Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. CEP 21040-900 Tel. 00.55.21.3865-8147, email: [alda@ioc.fiocruz.br](mailto:alda@ioc.fiocruz.br).

body of the text – 3,706 words

abstract - 200 words

## SUMMARY

HIV-1 infection causes an important impact on malaria infection. *Plasmodium falciparum* and HIV-1 co-infected patients (Pf/HIV) present high degree of anemia, enhanced parasitemia and decreased CD4<sup>+</sup> T counts, being at higher risk to develop severe malaria. Moreover, *P. falciparum* or HIV-1 infection each one alone causes extensive immune activation. Then, our hypothesis was that lymphocyte activation is potentiated in Pf/HIV co-infected patients, consequently worsening their immunosuppression state. For this, 22 Pf/HIV, 34 malaria, 29 HIV/AIDS and 10 healthy controls without malaria or HIV/AIDS (HC) from Maputo/Mozambique were recruited. As expected, anemia was most prevalent in Pf/HIV group. A huge variation in parasite density was observed in Pf/HIV (110-75,000 parasites/ $\mu$ L), although the median values were similar to malaria patients. CD4<sup>+</sup>T counts were significantly lower in Pf/HIV co-infected than HIV/AIDS or malaria patients. Lymphocyte activation was evaluated by the percentage of activation associated molecules (CD38 on TCD8<sup>+</sup> and HLA-DR on TCD3<sup>+</sup> cells). Highest expression of CD38 was detected in co-infected patients (median=78.2%). Malaria (median=50%) and HIV/AIDS (median=52%) patients also presented elevated levels of these molecules., although the values were lower than Pf/HIV co-infected cases Our findings suggest that enhanced T-cell activation displayed by co-infected can worsen the immune response to both diseases.

**Keywords.** malaria/HIV-AIDS, cellular activation, plasmodium, co-infection, T CD4+ cells, Mozambique,

**Sponsorship.** Instituto Oswaldo Cruz, internal funds and CAPES. HC is student from the Programa de Posgraduação em Ciências da Saúde/Programa de Posgraduação em Medicina Tropical, FIOCRUZ/INS-MISAU “Acordo Geral de Cooperação Brazil-Mozambique”. JRSO is a PhD student from PGMT, sponsored by CNPq and FAPERJ. AMC is a research fellow from CNPq and FAPERJ (JCNE).

## INTRODUCTION

Malaria and HIV/AIDS are two of the most important diseases in Africa, both being leading causes of morbidity and mortality (Idemyor et al. 2007). *Plasmodium falciparum*-associated HIV-1 (Pf/HIV) infection is described in many sub-Saharan Africa countries, whose contribution accounts for the most available clinical data on this co-infection (Davenport et al. 2010, Chalwe et al. 2009, Kiyingi et al. 2010, Mills et al. 2010, Serna-Bolea et al. 2010, Naniche et al. 2011). A relevant issue in malaria endemic regions is the identification of HIV/AIDS patients among suspect cases of acute malaria (Mills et al. 2010, Serna-Bolea et al. 2010). Furthermore, HIV-1 infection is a risk factor for receiving an incorrect diagnosis of malaria (Berg et al. 2008). In this scenario, surveillance health programs should spend considerable efforts to minimize misdiagnosis of febrile diseases.

In Mozambique (Mz), malaria is endemic throughout the country and reaches its highest point after the rainy season, which lasts from December to April. Malaria and HIV/AIDS figure as the most important cause of mortality reaching rates of 29% and 27%, respectively (INS/INE 2010). According to the World Malaria Report (WHO 2011), around 4 million estimated cases and 3,300 deaths due to malaria were reported in Mz during 2010. Considering that 11.5% of population is estimated to be infected with HIV-1, an overlapping of these dual endemic diseases leads to an increased risk for Pf and HIV co-infection. Recently, a study enrolling 136 HIV-1 infected individuals from Southwest Mz revealed that 5.1% of them were also harboring *P. falciparum* (Naniche et al. 2011).

There are evidences that co-infection enhance the spread of both falciparum malaria and HIV-1 infection and may also influence the severity of clinical manifestations of these diseases. Indeed, HIV infection has been considered an important risk factor for severe *P. falciparum* malaria (Grimwade et al. 2004, Chalwe et al. 2009). A higher plasmodium density parasitemia probably related to impairment of parasite control due to HIV-1 related immunosuppression is also observed (Whitworth et al. 2000, Patnaik et al. 2005). Patients with low CD4<sup>+</sup> T cells counts (less than 350 cells/mm<sup>3</sup>) are more likely to have malaria complications (Cohen et al. 2005, Mouala et al. 2009). Moreover, HIV-1 infection is associated with increased prevalence of anemia in falciparum malaria (Davenport et al. 2010, Otieno et al. 2006). On the other hand, malaria can also impact HIV-1 infection. HIV/AIDS patients who experienced malaria can present a transitory reduction of CD4<sup>+</sup> T



cells, which might be partially reversible after successful antimalarial therapy (Van Geertruyden et al. 2006). A causal relationship between malaria episode and CD4 cell count decline in HIV-1 patients remains to be established (Mermim et al. 2006). Acute malaria elevates HIV viral load, which in turn can enhance the risk for HIV transmission (Kublin et al. 2005). In addition, plasmodium antigens lead to strong cellular activation (Worku et al. 1997) that may facilitate *de novo* HIV-1 infection and replication (Froebel et al. 2004). HIV-1 preference for infecting activated memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes can increase cell death (Grossman et al. 2002). Consequently, it is possible that in co-infected patients, *P. falciparum* specific T-cell clones are getting depleted by HIV-1 during each malaria episode (Whitworth et al. 2005, Mermim et al. 2006). Therefore, these factors can conjecturally worsen immune response to both diseases and contribute to HIV disease progression.

Cell activation is one of the crucial mechanisms involved in the pathogenesis of both malaria (Worku et al. 1997) and HIV-1/AIDS (Douek et al. 2009). The consequent release of pro-inflammatory cytokines due to increased T cell activation during acute malaria is implicated in clinical complications and contributes to disbalance the effector/regulatory immune status (Ayimba et al. 2011, Davenport et al. 2012). In HIV-1/AIDS, it is well established that the viral load is directly associated with CD8<sup>+</sup> activation (Benito et al. 2004). However, the comprehension on how the association of these two pathogens can impact on the immunopathogenesis of malaria/HIV-AIDS remains under discussion. Few studies addressing immunological compromising have been reported in malaria/HIV-AIDS co-infection (Naniche et al. 2011) but to our knowledge, none has investigated the consequences of cellular activation in immunosuppression. As *P. falciparum* and HIV each one alone can cause immune activation, our hypothesis was that lymphocyte activation is potentiated in co-infected patients. As consequence, an activation induced lymphocyte death could aggravate their immunosuppression status. For this purpose, this study evaluated the severity of anemia, plasmodium parasite density and the impairment of cellular immune system in malaria plus HIV-1 co-infected adults from Southwest Mozambique.

## MATERIALS AND METHODS

*Study Population* - All patients were recruited from Polana Caniço Health Center (PCHC) in Maputo, Mozambique between January and December 2010. PCHC is an outpatient care health center situated in a suburb of Maputo city (capital of Mz) and provides medical care for patients from three neighborhoods: Maxaquene, Polana Caniço, and Hulene. Maputo is an area of stable malaria transmission ( $\geq 1$  case per 1,000 inhabitants) where a high percentage of individuals informs a past history of malaria (73-76%). HIV-1 prevalence in Mz is 11.5%, affecting around 9,000 individuals per year (INE 2009). In PCHC, the malaria care service is responsible for the diagnosis and antimalarial drugs dispense according to malaria management guidelines established by MISAU/Mz. This health center also attends and counsels HIV/AIDS patients.

A cross-sectional study was implemented and *P. falciparum*/HIV-1 co-infected patients were recruited among cases presenting clinical malaria. Ninety nine recruited participants were included into four groups: 22 HIV-1 and *P. falciparum* co-infected patients (Pf/HIV), 29 patients mono-infected with HIV-1 (HIV-1/AIDS), 38 mono-infected patients with *P. falciparum* (malaria), and a group of 10 subjects presenting a negative test for malaria or HIV-1 (Healthy Controls - HC). Demographic characteristics of the subjects are shown in Table 1. Most of the participants were female (59.2%). Their ages ranged from 20 to 75 years (mean age -  $38 \pm 12.2$ ; median - 37 years). Laboratorial exams were performed to diagnose anemia, malaria and HIV/AIDS according to the MISAU/Mz guidelines. The levels of hemoglobin (Hg) and white blood cells (WBC) were determined by complete hemogram exam. The results were expressed as g/dL for Hg and  $10^3/\mu\text{L}$  for WBC.

Patients were screened for malaria with a qualitative rapid diagnostic test (RDT, SD Malaria Antigen Pf BIO LINE kit, Standard Diagnosis Inc., Giheung-ku, Republic of South Korea) for detection of histidine rich protein II (HRP-II) of *P. falciparum* in blood. After their consent, patients with RDT positive test were screened for HIV according to the Mozambican National protocol. It consists of a sequential algorithm of two immunochromatographic rapid tests. All individuals were first screened using the Determine HIV-1/2 test (Abbott Laboratories CO.LTD, Tokyo Japan). All specimens reactive on the screening assay were further tested using the HIV test Uni-gold™ Recombigen® (Trinity Biotech plc, Bray Ireland). Thus, patients over 18 years old, HIV-1

infected without antiretroviral therapy (ARV) and with positive rapid diagnostic test for malaria were recruited for the co-infected group. Pregnant women were excluded from the study by pregnancy tests. Patients with positive test only for malaria or HIV-1 infection were enrolled in each one of mono-infected groups (malaria or HIV/AIDS). Volunteers who were negative for both tests composed the group of HC. HIV/AIDS patients were referred to the counseling program.

*Determination of Plasmodium parasite density* - RDT positive patients were investigated for plasmodium specie identification and parasite density. For malaria parasite density finger prick thick and blood smears stained with Giemsa were examined in oil-immersion microscopic (until the field where more than 500 WBC or 500 parasites were counted) by trained laboratory technicians. *P. falciparum* parasite density (PD) was calculated taking into consideration the actual leukocyte count, and was determined by the following formula:

PD: (number of parasites/number WBC in each slide) X WBC per mL from each patient X  $10^3$ . The results were expressed as number of parasites/ $\mu$ L.

*Determination of absolute T cells counts and lymphocyte activation levels* - To quantify CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in blood, a BD Tritest® monoclonal antibody specific for CD4/CD8/CD3 conjugated to FITC, PE and PerCP, respectively and BDTrue Count® reagent kit was used according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). In parallel, blood cells were also stained with anti-CD8 FITC/anti-CD38 PE and anti-CD3 FITC/anti-HLA-DR PE monoclonal antibodies (BD Simultest™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Samples were acquired using a FACSCalibur® (BD, USA) and analysed by Multiset® software (BD, USA) for CD4 counting and phenotypic analysis was carried out by CellQuest™ software both from BD Biosciences. The experiments were performed in the centers of reference for AIDS diagnosis from the Ministry Health of Mozambique (Laboratório de Biologia Molecular e de Hematologia do Hospital Central de Maputo, Laboratório de Parasitologia e de Imunologia do INS/MISAU) and in Brazil (Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, IOC/FIOCRUZ, MS), respectively.

Although the validated marker of CD8<sup>+</sup> T cell activation is the co-expression of CD38 and HLA DR, activated cells were identified through the detection of CD38 in CD8<sup>+</sup> and HLA-DR in CD3<sup>+</sup> T cells as a surrogate of this validated marker (Douek et al. 2009). HLA-DR positivity was determined on CD3<sup>+</sup> T cell population and the CD38 positivity was determined on CD8<sup>+</sup> T cell populations inside the gate previously established for TCD3<sup>+</sup>. The results were expressed as a percentage of HLA-DR in CD3 and CD38 in CD8<sup>high</sup>.

*Statistical analysis* - The values were expressed as median and interquartile range. Mann-Whitney U test and non-parametric Spearman's test were used for comparison and correlation analysis of the data, respectively (GraphPad Prism, version 4.0, San Diego, CA, USA). Significant differences were considered when  $p < 0.05$ .

*Ethics* - The study was approved by Mozambican Ethics Committee (Comitê Nacional de Bioética para Saúde), under number 194/CNBS and written informed consent was obtained from all participants.

## RESULTS

*Impact of the malaria-associated HIV/AIDS on the anemia severity* - The levels of hemoglobin were utilized to evaluate the degree of anemia (Figure 1). Co-infected patients had lower hemoglobin levels (median = 10.1 g/dL, IQ - 8.4 to 11.2 g/dL) when compared to patients mono-infected with *P. falciparum* (median = 12g/dL, IQ - 10.2 -13.3 g/dL,  $p < 0.001$ ) and HIV-1/AIDS (median = 11.4 g/dL, IQ - 11.2 to 12.6 g/dL,  $p < 0.05$ ) and HC (median = 12.8, IQ - 11.5 to 14 g/dL  $n=10$ ,  $p < 0.01$ ) (Figure 1). No significant differences were observed between malaria and HIV/AIDS patients or between HC and malaria or HIV/AIDS mono-infected patients.

*Parasite density in Plasmodium falciparum-HIV-1 co-infected patients* - Fifty-nine patients were positive for malaria by RDT, but just in thirty-three of them parasite density quantification was possible (Figure 2). There was no significant difference in parasite density when co-infected patients (median = 8,326 parasites/ $\mu$ L, IQ -1,087 to 20,357 parasites/ $\mu$ L,  $n=14$ ) were compared to malaria cases (median = 3,308 parasites/ $\mu$ L, IQ - 1,013 to 8,050 parasites/ $\mu$ L,  $n=19$ ). Although, high levels of parasitemia were found in

both groups, a wider variation in levels of parasite load was observed in co-infected patients (110-75,000 parasites/ $\mu$ L).

*Malaria associated HIV co-infected patients present low CD4<sup>+</sup> T lymphocytes levels* - In order to determine whether the association with malaria may influence the immunodepression caused by HIV-1 infection, the blood levels of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were quantified (Figure 3). Significantly lower CD4<sup>+</sup> T values were seen in Pf/HIV co-infected patients (median = 265 cells/mm<sup>3</sup>, IQ – 195 to 545 cells/mm<sup>3</sup>, n=22) compared to HIV-1/AIDS patients (median = 406 cells/mm<sup>3</sup>, IQ – 274 to 543 cells/mm<sup>3</sup>, n=29, p<0.05). These levels were also lower when compared to malaria patients (median = 597 cells/mm<sup>3</sup>, IQ – 318 to 868 cells/mm<sup>3</sup>, n=38, p<0.01) or to HC (median = 1,084 cells/mm<sup>3</sup>, IQ - 1,007 to 1,224 cells/mm<sup>3</sup>, n=10, p<0.001). In addition, patients HIV-1/AIDS also showed diminished levels of CD4<sup>+</sup> T cells when compared to malaria patients (p<0.05) or HC (p<0.001). Interestingly, a positive correlation between CD4<sup>+</sup> T cells counts and hemoglobin levels was observed when all groups were evaluated together (r = 0.40, p<0.001, data not shown).

*The association of malaria plus HIV enhances the T cell activation status* - To evaluate whether *P. falciparum* infection may contribute to augment the status of activation in Pf/HIV co-infected patients, the percentage of activated CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were measured by flow cytometry through expression of activation associated membrane molecules HLA-DR and CD38, respectively.

Pf/HIV co-infected patients presented the highest levels of lymphocyte activation when compared to other groups (Figure 4A). The levels of HLA-DR<sup>+</sup> on CD3<sup>+</sup> T cells in Pf/HIV patients were statistically higher (median = 67.5%, IQ – 39.3 to 77.8%, n=17) than malaria patients (median = 32.1%, IQ – 21.2 to 45%, n=29, p<0.001) and HIV-AIDS patients (median = 48.8%, IQ – 28.8 to 57%, n=13, p<0.05). It was interesting to note that malaria patients also presented high levels of HLA-DR<sup>+</sup> on CD3<sup>+</sup> T cells, although still lower than those observed in HIV-1/AIDS patients (p<0.05).

In relation to the percentage of CD38<sup>+</sup> on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (Figure 4B) the status of cellular activation was also more elevated in Pf/HIV co-infected (median = 78.2%, IQ – 43.5 to 85%, n=17) in comparison to malaria patients (median = 50%, IQ – 37.3 to 61.5%, n=29, p<0.01). However, no statistic difference was found in relation to HIV-1/AIDS

patients (median = 52%, IQ – 49.8 to 73.1%, n=13). Elevated levels of activation were observed in malaria and HIV-1/AIDS patients, without differences among these groups. As expected, the lowest levels of cellular activation were observed in HC (HLA-DR<sup>+</sup>, median = 3.4%, IQ – 2.6 to 7% and CD38<sup>+</sup>, median = 28.9%, IQ – 25 to 35.3%).

In order to verify whether parasitemia could be involved in cellular activation in Pf/HIV co-infected patients, correlation analysis was performed. For this purpose 17 Pf/HIV co-infected and 29 malaria mono-infected patients were investigated. No significant correlation between parasite density and the percentage of HLA-DR<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup> on T lymphocytes was observed for both groups. On the other hand, a negative correlation between CD4<sup>+</sup> T counts and HLA-DR in CD3<sup>+</sup> T lymphocytes was found when patients and HC were considered together ( $r = -0.70$ ,  $p < 0.01$ ; Figure 5).

## DISCUSSION

Most available data on malaria-associated HIV-AIDS is related to the consequences of HIV infection on the degree of anemia, plasmodium parasite intensity and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes counts in falciparum malaria patients, especially in sub-Saharan Africa countries (Whitworth et al. 2000, Cohen et al. 2005, Patnaik et al. 2005, Davenport et al, 2010, Mouala et al. 2009). Nevertheless, the impact of both infections to the status of immune cellular activation is largely unknown. This study investigated whether the immune activation generated by *Plasmodium* and HIV each one could be synergized by co-infection. Our results suggest that falciparum malaria enhances T lymphocyte activation in individuals concomitantly infected by HIV-1. This phenomenon can affect immune effector function and may constitute an additional mechanism to contribute for pathogenesis of the malaria-associated HIV/AIDS disease.

Anemia is a major symptom of malaria and it can be caused by several mechanisms, including the destruction of infected erythrocytes, antibody mediated lysis, hypersplenism, impaired erythropoiesis and cytokines (Idemyor et al. 2007, Haldar et al. 2009, Quintero et al. 2011). A previous study has reported that 10% of adults with severe malaria presented hemoglobin levels of 7g/dl or less i.e. much lower than expected for healthy individual (WHO 2000). Moreover, HIV-1 infection itself can also cause anemia (Belperio et al.

2004), constituting an important risk factor for severe malaria in adults (Grimwade et al. 2004, Chalwe et al. 2009). In our study, anemia was present in a higher degree in Pf/HIV co-infected patients, since they had lower hemoglobin levels in comparison to malaria patients. This difference should not be related to gender once in both groups the percentage of females was higher than males. In addition, hemoglobin concentration and parasite density correlate neither to Pf/HIV co-infected patients nor to malaria cases. These results were in agreement with other studies from sub-Saharan areas for malaria transmission as in Cameroon (Nkuo Akenji et al. 2002) and Kenya (Davenport et al. 2010). However, conflicting results regarding anemia have also been found in Kenya (Mc Elroy et al. 2000) and Tanzania (Ekval et al. 2001). Both, HIV and malaria along with other conditions as malnutrition, antiretroviral drugs or intestinal parasites, reinforce the idea that co-infections can worsen the anemia condition especially in low income regions.

Immunosuppression due to HIV infection appears to impair malaria patient's ability to control the parasitemia, enhancing plasmodium parasite density (Van Geertruyden et al. 2006). Despite reports that HIV individuals are more likely to be parasitemic (Whitworth et al. 2000, Patnaik et al. 2005) a significant difference for parasite load was not found between Pf/HIV co-infected and malaria patients studied here. It is important to stress that in our study parasitemia intensity calculation was based on individual leukocyte count/mL instead of fixed number of leukocytes per mL. Curiously, a wide dispersion of parasite density levels was detected in Pf/HIV co-infected group, varying from 110 to 75,000 parasites/ $\mu$ L.

Depletion of CD4<sup>+</sup> T cells is one of the most common consequences of HIV-1 infection (Grossman et al. 2002). However, acute malaria also reduces CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (Chougnet et al. 1990, Kassa et al. 2006). In patients evaluated here, the lowest CD4<sup>+</sup> T values were found in co-infected patients when compared with other groups. CD4<sup>+</sup> T cells in malaria or HIV/AIDS patients were also lower than HC. These results suggest a heightened degree of immunosuppression in malaria-associated HIV-1/AIDS. Interestingly, this reduction of CD4<sup>+</sup> T cells is transient, rising after a successful antimalarial therapy, although not reaching previous counts (Kassa et al. 2006, Van Geertruyden et al. 2006). Then, each episode of acute malaria causes an excess decrease in CD4<sup>+</sup> T values (Mermim et al. 2006), aggravating the immunodepression status. These facts highlight the importance of malaria induced laboratorial disturbances to be assessed

before taking any decision on the management of HIV positive individuals, such as a misdiagnosed ARV failure or even a premature initiation of therapy (Brentlinger et al. 2007). Unfortunately, the access to ARV is not yet universal neither in Mozambique (INSIDA/MISAU 2009) nor in other African countries, as antimalarials are.

CD4<sup>+</sup> T cell counts have been implicated in plasmodium control (Brentlinger et al. 2007, Idemyor et al. 2007), since these cells were negatively correlated to the parasite density (Withworth et al. 2000, Patnaik et al. 2005). However, we did not find any association between these parameters, maybe because of the number of studied patients. Moreover, considering that adult population evaluated in this study is from a stable transmission area, they are considered to be immune, and therefore, parasitemia is supposed to be lower than children from the same area. We reasoned that probably because of this fact, no correlation was found between parasite intensity and immunosuppression.

Chronic immune activation is the strongest predictor of the progression rate to AIDS in HIV-1 infected individuals (Douek et al. 2009). Acute malaria infection also may be associated with an enhanced cell activation status. In both, HIV/AIDS or malaria alone, co-expression of CD38/HLA-DR on T cell subsets have already been studied (Hunt et al. 2003, Eggena et al. 2006, Nanche et al. 2011) and immune activation was considered a predictor for treatment failure in malaria patients (Eggena et al. 2006). Previous report has shown that malaria infection can present a pro-inflammatory response and cytokine disbalance (Ayimba et al. 2011, Davenport et al. 2012). In the present study, Pf/HIV co-infected patients showed the highest percentages of HLA-DR and CD38 on CD3<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, respectively. Indeed, malaria patients had higher percentages of CD38 on CD8<sup>+</sup> and HLA-DR on CD3<sup>+</sup> than the healthy subjects, confirming previous data that malaria itself contributes to activation (Worku et al. 1997). Even considering that dual positive CD38 HLA-DR CD8 is more accurate for analyzing activation status, both molecules separated presented the same profile when the results were compared. As observed for CD4<sup>+</sup> T counts, viral or parasite antigens seem to act together boosting cell activation, either directly or by inducing the release of soluble factors. HIV-1 co-infection with other diseases as leishmaniasis (Santos-Oliveira et al. 2010), tuberculosis (Rodrigues et al. 2003), or leprosy (Gripp et al. 2011) have already been proven to increase cellular activation. A previous work conducted in Mz did not reach correlation between the parameter “malaria infection” and the levels of HLA-DR/CD38 on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells



activated (Naniche et al. 2011). However, these authors did not compare Pf/HIV co-infected to malaria or HIV/AIDS cases alone. We may not exclude that other clinical conditions could contribute to this activation, as opportunistic infections, because these patients were diagnosed to HIV infection during the malaria trial.

Viral replication is a well standard condition for lymphocyte activation and is considered a predictor parameter for HIV viral load (Benito et al. 2004). Nevertheless, a limitation of our study was not to determine the HIV-1 viral load, since this assessment is not routinely available for African public health systems (INS/INE 2010). The present study did not found a causality relationship between Pf parasite density and T cells activation. However, malarial antigens cannot be ruled out as an important factor for immune activation. Then, the role of each infection in this exacerbated activation status and further implications in the pathogenesis and management of malaria/HIV-1 co-infection need to be clarified. In addition, we did not follow up Pf/HIV co-infected patients during malaria convalescence in order to evaluate if T-cell activation status decreased and achieved the activation levels of malaria or HIV/AIDS cases alone.

Taking together our results demonstrate that falciparum malaria in HIV-1 infected patients from Southwest Mz share similar profiles of anemia, plasmodium parasitemia and CD4<sup>+</sup> T counts observed in other Sub-Sahara African studies (Patnaik et al. 2005, Davenport et al. 2010, Van Geertruyden et al. 2006). In complement to these studies, our findings suggest that malaria/HIV-AIDS co-infection may contribute to enhanced T cell activation in co-infected patients. This phenomenon is of utmost importance since these cells can: 1) augment the release of proinflammatory cytokines causing systemic damage (Andrade et al 2010); 2) be more susceptible to die by activation induced cell death (Kemp et al. 2002). Finally, potential regional differences are expected to occur depending on the malaria endemicity. Additional studies in Sub-Saharan Africa countries, including prospective follow up are of extremely interest to better understand the relationship between these two pathogens and its consequences to the immunopathogenesis of malaria/HIV-AIDS co-infection.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Dr. Simone Ladeia for critical reviewing the manuscript, to the health workers from Polana Caniço Health Center outpatient unit for helping recruitment of patients, to Ms. Elisa M. Mahanjane for helpful secretarial assistance and to Departamento de Parasitologia and Imunologia, INS/MISAU and Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular-IOC/Fiocruz for allowing the use of equipments and technical help. We are grateful to Dr Ilesh Jani and to Dr Wilson Savino (coordinators of PGCS, INS/MISAU-FIOCRUZ for their support during the development of this study

## REFERENCES

- Ayimba E, Hegewald J, Ségbéna AY, Gantin RG, Lechner CJ, Agossou A, Banla M, Soboslay PT Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria 2011. *Clin Exp Immunol* 166: 218-26.
- Belperio PS, Rhew DC 2004. Prevalence and outcomes of anemia in individuals with human immunodeficiency virus: a systematic review of the literature. *Am J Med* 116 Suppl 7A: 27S-43S.
- Benito JM, Lopez M, Lozano S, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V 2004. CD38 expression on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 227-233.
- Berg A, Patel S, Langeland N, Blomberg B 2008. Falciparum malaria and HIV-1 in hospitalized adults in Maputo, Mozambique: does HIV-infection obscure the malaria diagnosis? *Malar J* 7: 252.
- Brentlinger PE, Behrens CB, Kublin JG 2007. Challenges in the prevention, diagnosis, and treatment of malaria in human immunodeficiency virus infected adults in sub-Saharan Africa. *Arch Intern Med* 167: 1827-36.
- Chalwe V, Van geertruyden JP, Mukwamataba D, Menten J, Kamalamba J, Mulenga M, D'Alessandro U 2009. Increased risk for severe malaria in HIV-1-infected adults, Zambia. *Emerg Infect Dis* 15: 749
- Chougnet C, Tallet S, Ringwald P, Deloron P 1992. Kinetics of lymphocyte subsets from peripheral blood during a *Plasmodium falciparum* malaria attack. *Clin Exp Immunol* 90: 405-8.
- Cohen C, Karstaedt A, Frean J, Thomas J, Govender N, Prentice E, Dini L, Galpin J, Crewe-Brown H 2005. Increased prevalence of severe malaria in HIV-infected adults in South Africa. *Clin Infect Dis* 41: 1631-7.

- Douek D, Roederer M, Koup R 2009. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med* 60: 471-84.
- Davenport GC, Hittner JB, Were T, Ong'echa JM, Perkins DJ 2012. Relationship between inflammatory mediator patterns and anemia in HIV-1 positive and exposed children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Hematol* 14.
- Davenport GC, Ouma C, Hittner JB, Were T, Ouma Y, Ong'echa JM, Perkins DJ 2010. Hematological predictors of increased severe anemia in Kenyan children coinfecting with *Plasmodium falciparum* and HIV-1. *Am J Hematol* 85: 227-33.
- Eggena MP, Hopkins H, Barugahare B, Okello M, Ssali F, Mugenyi P, Rosenthal PJ, Cao H, Dorsey G 2006. CD4 T cell activation as a predictor for treatment failure in Ugandans with *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 74: 41-3.
- Ekvall H, Premji Z, Bennett S, Bjorkman A 2001. Hemoglobin concentration in children in a malaria holoendemic area is determined by cumulated *Plasmodium falciparum* parasite densities. *Am J Trop Med Hyg* 64: 58-66.
- Froebel K, Howard W, Schafer JR, Howie F, Whitworth J, Kaleebu P, Brown AL, Riley E 2004. Activation by malaria antigens renders mononuclear cells susceptible to HIV infection and re-activates replication of endogenous HIV in cells from HIV-infected adults. *Parasite Immunol* 26: 213-7.
- Grimwade K, French N, Mbatha DD, Zungu DD, Dedicoat M, Gilks CF 2004. HIV infection as a cofactor for severe falciparum malaria in adults living in a region of unstable malaria transmission in South Africa. *AIDS* 18: 547-54.
- Giaccoia-Gripp CB, Sales AM, Nery JA, Santos-Oliveira JR, de Oliveira AL, Sarno EN, Morgado MG 2011. Evaluation of cellular phenotypes implicated in immunopathogenesis and monitoring immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV/leprosy cases. *PLoS One* 6: e28735.

- Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE 2002. CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* 8: 319-23.
- Haldar K, Mohandas N 2009. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 87-93.
- Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, Deeks SG 2003. T cell activation is associated with lower CD4<sup>+</sup> T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 187: 1534-43.
- Idemyor V 2007. Human immunodeficiency virus (HIV) and malaria interaction in sub-Saharan Africa: the collision of two Titans. *HIV Clin Trials* 8: 246-53.
- Instituto Nacional de Estatística (INE). 2009. Mortalidade em Moçambique: Inquérito Nacional sobre as causas de Mortalidade, 2007/2008 – Relatório Preliminar. Maputo, Moçambique: INE
- Instituto Nacional de Saúde (INS), Instituto Nacional de Estatística (INE) e ICF Macro. 2010. Inquérito Nacional de Prevalência, Riscos Comportamentais e Informação sobre o HIV e SIDA em Moçambique 2009. Calverton, Maryland, EUA: INS, INE e ICF Macro.
- Kassa D, Petros B, Mesele T, Hailu E, Wolday D 2006. Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol* 13: 376-9.
- Kemp K, Akanmori BD, Adabayeri V, Goka BQ, Kurtzhals JA, Behr C, Hviid L 2002. Cytokine production and apoptosis among T cells from patients under treatment for *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol* 127: 151-7.
- Kiyingi HS, Egwang TG, Nannyonga M 2010. Prolonged elevation of viral loads in HIV-1-infected children in a region of intense malaria transmission in Northern Uganda: a prospective cohort study. *Pan Afr Med J* 7:11.

- Kublin JG, Patnaik P, Jere CS, Miller WC, Hoffman IF, Chimbiya N, Pendame R, Taylor TE, Molyneux ME 2005. Effect of *Plasmodium falciparum* malaria on concentration of HIV-1-RNA in the blood of adults in rural Malawi: a prospective cohort study. *Lancet* 365: 233-40.
- McElroy PD, ter Kuile FO, Lal AA, Bloland PB, Hawley WA, Oloo AJ, Monto AS, Meshnick SR, Nahlen BL 2000. Effect of Plasmodium falciparum parasitemia density on hemoglobin concentrations among full-term, normal birth weight children in western Kenya, IV. The Asembo Bay Cohort Project. *Am J Trop Med Hyg* 62: 504-12.
- Mermin J, Lule JR, Ekwaru JP 2006. Association between malaria and CD4 cell count decline among persons with HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41: 129-30.
- Mills LA, Kagaayi J, Nakigozi G, Galiwango RM, Ouma J, Shott JP, Ssempijja V, Gray RH, Wawer MJ, Serwadda D, Quinn TC, Reynolds SJ 2010. Utility of a point-of-care malaria rapid diagnostic test for excluding malaria as the cause of fever among HIV-positive adults in rural Rakai, Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 82: 145-7.
- Mouala C, Guiguet M, Houz  S, Damond F, Pialoux G, Viget N, Costagliola D, Le Bras J, Matheron S; FHDH-ANRS CO4 Clinical Epidemiology Group 2009. Impact of HIV infection on severity of imported malaria is restricted to patients with CD4 cell counts < 350 cells/microl. *AIDS* 23: 1997-2004.
- Naniche D, Letang E, Nhampossa T, David C, Menendez C, Alonso P 2011. Alterations in T cell subsets in human immunodeficiency virus-infected adults with co-infections in southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg* 85: 776-81.
- Nkuo Akenji TK, Ajame EA, Achidi EA 2002. An investigation of symptomatic malaria parasitaemia and anaemia in nursery and primary school children in Buea District Cameroon. *Cent Afr J Med* 48: 1-4.
- Otieno RO, Ouma C, Ong'echa JM, Keller CC, Were T, Waindi EN, Michaels MG, Day RD, Vulule JM, Perkins DJ 2006. Increased severe anemia in HIV-1-exposed and HIV-1-positive infants and children during acute malaria. *AIDS* 20: 275-80.

- Patnaik P, Jere CS, Miller WC, Hoffman IF, Wirima J, Pendame R, Meshnick SR, Taylor TE, Molyneux ME, Kublin JG 2005. Effects of HIV-1 serostatus, HIV-1 RNA concentration, and CD4 cell count on the incidence of malaria infection in a cohort of adults in rural Malawi. *J Infect Dis* 192: 984-91.
- Quintero JP, Siqueira AM, Tobón A, Blair S, Moreno A, Arévalo-Herrera M, Lacerda MV, Valencia SH 2011. Malaria-related anaemia: a Latin American perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 Suppl 1:91-104.
- Rodrigues DS, Cunha RM, Kallas EG, Salomão R 2003. Distribution of naive/effector CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and expression of CD38 on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in AIDS patients with tuberculosis. *Braz J Infect Dis* 7: 161-165.
- Santos-Oliveira JR, 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 2010. High levels of T lymphocyte activation in *Leishmania*-HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load. *BMC Infect Dis* 10: 358.
- Serna-Bolea C, Muñoz J, Almeida JM, Nhampossa T, Ferreira E, Alonso P, Naniche D 2010. High prevalence of symptomatic acute HIV infection in an outpatient ward in southern Mozambique: identification and follow-up. *AIDS* 24: 603-8.
- Van Geertruyden JP, Mulenga M, Kasongo W, Polman K, Colebunders R, Kestens L, D'Alessandro U 2006. CD4 T-cell count and HIV-1 infection in adults with uncomplicated malaria. *J Acquir Immune Defic Syndr* 43: 363-7.
- Van Geertruyden JP, Mulenga M, Mwananyanda L, Chalwe V, Moerman F, Chilengi R, Kasongo W, Van Overmeir C, Dujardin JC, Colebunders R, Kestens L, D'Alessandro U 2006. HIV-1 immune suppression and antimalarial treatment outcome in Zambian adults with uncomplicated malaria. *J Infect Dis* 194: 917-25.
- Whitworth JA, Hewitt KA 2005. Effect of malaria on HIV-1 progression and transmission. *Lancet* 365: 196-7.

- Whitworth J, Morgan D, Quigley M, Smith A, Mayanja B, Eotu H, Omoding N, Okongo M, Malamba S, Ojwiya A 2000. Effect of HIV-1 and increasing immunosuppression on malaria parasitaemia and clinical episodes in adults in rural Uganda: a cohort study. *Lancet* 356: 1051-6.
- WHO. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster 2000. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: Suppl 1: S1-S90.
- WHO. World Health Organization, World Malaria Report 2011. Available at: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106_eng.pdf)>. Accessed in: Feb 12, 2012.
- Worku S, Björkman A, Troye-Blomberg M, Jemaneh L, Färnert A, Christensson B 1997. Lymphocyte activation and subset redistribution in the peripheral blood in acute malaria illness: distinct gammadelta+ T cell patterns in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections. *Clin Exp Immunol* 108: 34-41.



Table 1. Demographic characteristics of study population.

Cases/controls	Number of cases	Age	Distribution per gender			
		mean±SD* (median)	Male (40.7)	%	Female (59.2)	%
Pf/HIV co-infected	22	38.2±15(34)	36.4		63.6	
Malaria	38	39.4±13(39)	31.6		68.4	
HIV/AIDS	29	37±10.8(36)	51.7		48.3	
Healthy controls	10	34.5±7(34)	50.0		50.0	

SD – standard deviation, \* no statistical difference among the four groups.

Pf – *Plasmodium falciparum*, Healthy controls – subjects without malaria or HIV/AIDS.

## Figure Legends

Figure 1. Anemia severity estimated by hemoglobin concentration in *Plasmodium falciparum* (Pf) malaria-associated HIV/AIDS patients. Pf/HIV co-infected patients (black and white circles), Pf malaria patients (white circles) and HIV/AIDS patients (black circles) and healthy controls (HC) without malaria or HIV/AIDS (solid triangles). Each point represents one subject. The horizontal bars express median.

Figure 2. Determination of *Plasmodium falciparum* (Pf) parasite density in HIV co-infected patients. Pf forms were counted in thick smears until the field where more than 500 WBC or 500 parasites were counted. The parasite density was calculated according to the formula shown in Material and Methods section, considering individual actual leukocytes counts per mL. Pf/HIV co-infected patients (black and white circles) and Pf malaria patients (white circles). Each point represents one subject. The horizontal bars express median. There was no statistic difference between groups.

Figure 3. Evaluation of immunosuppression status in malaria associated HIV-1/AIDS patients by the absolute number of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. Pf/HIV co-infected patients (black and white circles), Pf malaria patients (white circles) and HIV/AIDS patients (black circles) and healthy controls (HC) without malaria or HIV/AIDS (solid triangles). Each point represents one subject. The horizontal bars express median.

Figure 4. T lymphocyte activation status in malaria associated HIV-1/AIDS patients. Pf/HIV co-infected patients (black and white circles), Pf malaria patients (white circles) and HIV/AIDS patients (black circles) and healthy controls (HC) without malaria or HIV/AIDS (solid triangles). The flow cytometry analysis of the percentage of HLA-DR on CD3<sup>+</sup> T (A) and CD38 on CD8<sup>+</sup> T (B) cells were determined in lymphocytes gates as described in Materials and Methods section. Each point represents one subject. The horizontal bars express median.

Figure 5. Correlation between CD4<sup>+</sup> T cells counts and HLA-DR<sup>+</sup> on CD3<sup>+</sup> T lymphocytes in malaria associated HIV-1/AIDS patients. Pf/HIV co-infected patients (black and white circles), Pf malaria patients (white circles) and HIV/AIDS patients (black circles) and healthy controls (HC) without malaria or HIV/AIDS (solid triangles).

Figure 1.

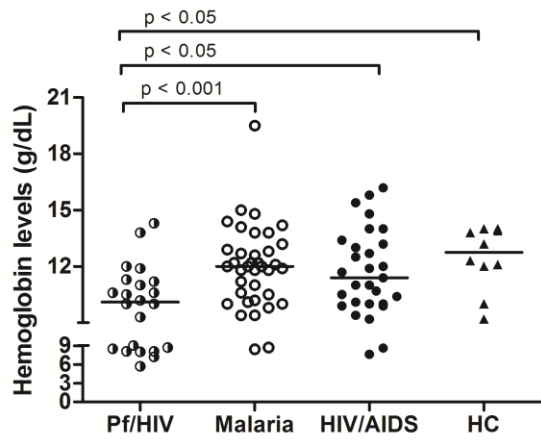


Figure 2.

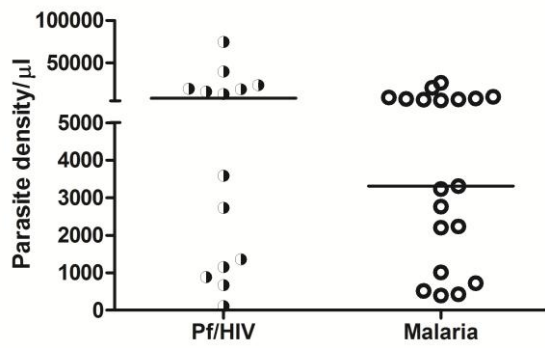
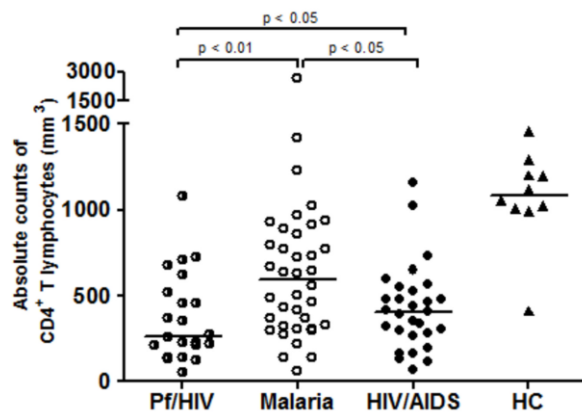
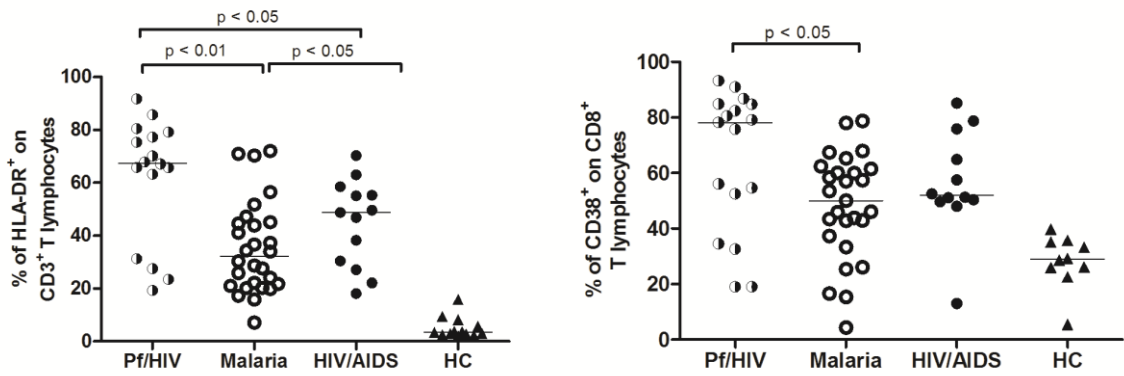


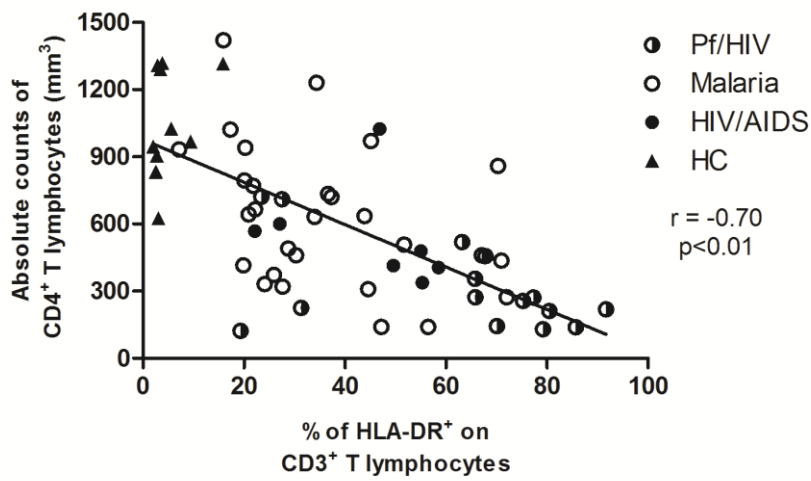
Figure 3.



**Figure 4.**



**Figure 5.**



## Anexo 5

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

Instituição Proponente: Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Laboratório de Imunoparasitologia. Av. Brasil, 4365, Pav. Leônidas Deane sala 408, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ. Tel 0XX21-3865-8102. Instituição Responsável: \_\_\_\_\_

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

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

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

Colaboradores/Médicos assistentes e Instituição/telefone de contato:

\_\_\_\_\_

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

Nome do Responsável: \_\_\_\_\_

Eu declaro que aceito participar como voluntário da investigação científica coordenada pela Dra. Alda Maria Da-Cruz e com a participação do meu médico Dr.

\_\_\_\_\_.

Neste estudo os pesquisadores querem descobrir as pessoas que tem leishmaniose e possam ter AIDS ou pessoas que têm AIDS e possam ter leishmaniose. O objetivo melhorar os conhecimentos sobre os sintomas e o diagnóstico destas doenças, além de estudar como o sistema imunológico do organismo de uma pessoa que tem AIDS reage quando ela apresentar, ao mesmo tempo, a leishmaniose. Nos casos em que houver as duas doenças, será realizado um acompanhamento clínico e laboratorial dos pacientes. Nos casos de leishmaniose sem AIDS, os pacientes também poderão fazer parte do estudo caso seja de sua vontade. Fui informado que este estudo poderá não me beneficiar diretamente, embora tenha a possibilidade de serem descobertos exames de laboratório que poderão ajudar a prevenir a evolução da leishmaniose. Os resultados dos exames deverão ser comunicados e entregues a mim ou ao médico responsável por meu acompanhamento.

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

1. Responder a um questionário contendo informações pessoais, da minha residência e das doenças que apresentei ou tenho neste momento.
2. Consulta ambulatorial periódica para realização de exame clínico e exames laboratoriais de rotina procedimentos necessários para o diagnóstico da leishmaniose (coleta de sangue, biópsia e teste de Montenegro). Não aplicável aos indivíduos sadios.

3. Teste de Montenegro. Este consiste na aplicação de 0,1 ml de uma solução contendo parasitos mortos pelo mertiolate. A leitura é feita em 48h. Este poderá ser repetido quando for necessário avaliar minha imunidade para a leishmaniose. Não aplicável aos indivíduos sadios.
4. Coleta de 40 ml de sangue através de agulha que fará punção da veia do braço. Esta coleta deverá ser repetida periodicamente (a cada três ou seis meses).
5. Coleta de sangue para realizar sorologia anti-HIV com minha autorização.
6. Caso haja o diagnóstico de AIDS serei acompanhado e tratado.

Esclarecimentos sobre os procedimentos e inconvenientes:

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

O volume de sangue retirado não causa distúrbios ou riscos ao organismo. Os possíveis desconfortos, se ocorrerem, são relacionados a problemas durante a retirada do sangue, como extravasamento de sangue que causam dor e hematoma, mas que regredem após 3 a 5 dias. Para o diagnóstico também será realizada uma biópsia da úlcera para quem tem suspeita de doença na pele ou retirada de sangue da medula para quem tem suspeita de doença nas vísceras também serão realizados para o diagnóstico. Os indivíduos alérgicos ao anestésico NÃO poderão ser biopsiados. As complicações que podem ocorrer são dor e sangramento que regredem geralmente ao final de dois a três dias. Todo o material retirado do meu corpo deverá ser utilizado somente para fins de diagnóstico e pesquisa. Autorizo que eles sejam guardados na FIOCRUZ ou nas Instituições que participam desta pesquisa, para serem utilizados em futuros projetos de pesquisa após análise e aprovação de um Comitê de Ética. Os investigadores deverão, a qualquer momento, esclarecer minhas dúvidas sobre o estudo e a doença, a utilização do material biológico retirado do meu corpo e os resultados obtidos com o estudo. Os autores deverão guardar meus dados, sendo eles sigilosos e confidenciais. Os resultados poderão ser divulgados na forma de comunicação científica, mas não permito a minha identificação. A qualquer momento poderei me retirar deste estudo sem qualquer prejuízo ao meu tratamento.

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

---

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

Voluntário/ : \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_  
Responsável \_\_\_\_\_  
assinatura

Testemunha: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_  
Assinatura

Investigador: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_  
assinatura

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
**Voluntários - Pacientes**

Instituição Proponente: Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Laboratório de Imunoparasitologia. Av. Brasil, 4365, Pav. Leônidas Deane sala 408, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ. Tel 0XX21-3865-8102. 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

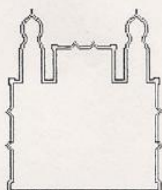
Investigador: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

assinatura



## Anexo 6

### Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do Instituto Oswaldo Cruz



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. chagasi*) 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 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



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:**

*Lea Camillo-Coura*

Dr.<sup>a</sup> Lea Camillo-Coura  
Coordenadora do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
IPEC / FIOCRUZ