

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSETAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR NA
COINFEÇÃO POR HIV E *LEISHMANIA*

LUANA LEANDRO GOIS

Salvador – Brasil

2011

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR NA
COINFECÇÃO POR HIV E *LEISHMANIA*

LUANA LEANDRO GOIS

Orientadora: Maria Fernanda Rios Grassi

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para obtenção do
grau de Mestre.

Salvador – Brasil

2011

Dedico esta dissertação a Deus, aos meus familiares e amigos e a Tiago Lima.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Maria Fernanda Rios Grassi pela oportunidade, confiança, dedicação, orientação e principalmente, pelo exemplo e ensinamentos na pesquisa científica;

Ao Dr. Bernardo Galvão pela oportunidade e grande exemplo na pesquisa científica;

Ao Dr. Roberto Badaró pelo auxílio na execução do projeto e na escrita dos manuscritos;

Aos colaboradores do projeto Dr. Sanjay Mehta e Dr. Robert Schooley pelo apoio e auxílio em todo o trabalho;

A Dra. Zilma Rodrigues pelo apoio e incentivo durante o período da iniciação científica;

Ao Dr. Sérgio Marcos Arruda e a Dra. Cláudia Ida Brodskyn pelas contribuições para a versão final da dissertação;

Aos pacientes, motivação principal deste trabalho, que gentilmente aceitaram participar;

A equipe da Plataforma de Citometria de Fluxo, Dr. Jorge Clarêncio Souza Andrade e Ms. Liliane Cunha, pela ajuda na aquisição das amostras;

Aos colegas e amigos do Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), pelo acolhimento, incentivo, parceria e pelas ajudas indispensáveis durante todo o período do mestrado e da iniciação científica;

Ao grupo de Imunologia do LASP, principalmente Dra. Rita Elizabeth Mascarenhas e Ms. Raimundo Coutinho, pelas importantes discussões científicas, pelo exemplo no laboratório e na execução da pesquisa;

A coordenação de pesquisa da Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa (PgBSMI), sobretudo Taíse Coutinho Cáeres, pela paciência e orientação;

Ao colegiado e professores da PgBSMI pelo profissionalismo e competência;

Ao apoio institucional e pela bolsa auxílio do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fiocruz-BA;

Ao apoio financeiro do *Center for AIDS Research (Cfar)*.

GOIS, Luana Leandro. Avaliação da resposta imune celular na coinfeção por HIV/*Leishmania*. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

RESUMO

A *Leishmania* é considerada um patógeno oportunista em indivíduos infectados pelo HIV. Os mecanismos imunopatogênicos pelos quais o HIV e a *Leishmania* interagem não estão bem esclarecidos. Assim como, não está definido de que forma a infecção pelo HIV provoca alterações na resposta imune celular específica à *Leishmania*, o que conduz às apresentações atípicas e disseminadas da leishmaniose descritas nos pacientes coinfectados. O objetivo desta dissertação foi avaliar a resposta imune celular dos pacientes coinfectados por HIV e *Leishmania*, mais especificamente avaliar a resposta Th1 e perfil das subpopulações de linfócitos T de memória. Para tal, foi avaliada a resposta linfoproliferativa ao antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) e a proporção das subpopulações de memória central e efetora dos linfócitos T CD4⁺ específicos para *Leishmania* por citometria de fluxo. O índice de divisão celular dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ após o estímulo com SLA dos pacientes coinfectados foi estatisticamente menor em comparação com os pacientes infectados apenas por *Leishmania*. A resposta proliferativa dos linfócitos T CD4⁺ ao SLA foi observada em 25 % dos pacientes coinfectados, enquanto que em 12 % dos pacientes coinfectados foi observada proliferação dos linfócitos T CD8⁺ em resposta ao SLA. Entretanto, em todos os pacientes infectados apenas por *Leishmania* foi notada a linfoproliferação em resposta ao SLA. As proporções de linfócitos T CD4⁺ de memória central e efetora específicos para *Leishmania* foram similares entre os pacientes coinfectados e os pacientes infectados apenas por *Leishmania*. Entretanto, o número absoluto dos linfócitos T CD4⁺ de memória central e efetora foi significativamente menor nos pacientes coinfectados em comparação aos pacientes infectados apenas por *Leishmania*. Os resultados demonstram um prejuízo funcional na imunidade celular específica dos pacientes coinfectados.

Palavras-chaves: Coinfecção HIV/*Leishmania*; resposta imune celular; recuperação imune.

GOIS, Luana Leandro. Avaliação da resposta imune celular na coinfeção por HIV/*Leishmania*. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

ABSTRACT

The *Leishmania* is opportunistic pathogens in HIV-1-infected individuals. The immunopathogenic mechanisms by which HIV and *Leishmania* adversely affect each other are unclear. Furthermore, the impact of HIV-1 on *Leishmania*-specific cellular immune response leads to atypical and disseminated lesions as described in co-infected patients. The aim of this dissertation is to evaluate the cellular immune response of HIV and *Leishmania* co-infected patients, specifically to evaluate the profile Th1 and the memory CD4⁺ T-cell subset. The proliferative response of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells to soluble *Leishmania* antigens (SLA) and the frequency memory *Leishmania*-specific CD4⁺ T-cell were performed flow cytometry. The median of cell division index of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells after stimulation with SLA from co-infected patients was significantly lower than in patients infected *Leishmania* solely. A proliferative response of CD4⁺ T-cells after stimulation with SLA was observed in 25 % of co-infected patients, while in 12 % of co-infected patients had a proliferative response in the CD8⁺ T-cells to SLA. In contrast, both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells subset from all patients infected with *Leishmania* solely proliferated in response to SLA. The proportion of *Leishmania*-specific central and effector memory CD4⁺ T-cells were similar between the co-infected patients and patients infected *Leishmania* solely. However, the median of absolute number of *Leishmania*-specific central and effector memory CD4⁺ T-cells from co-infected patients were significantly lower compared to patients infected *Leishmania* solely. These results demonstrate the impairment in cellular immune response.

Keywords: HIV/*Leishmania* co-infection; cellular immune response; Immune recovery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de diferenciação de células CD4 ⁺ Th1 e Th2.....	15
Figura 2. Prevalência global do HIV.....	19
Figura 3. Distribuição mundial da leishmaniose e os países que reportaram casos de coinfeção HIV/ <i>Leishmania</i>	23
Figura 4. Áreas de risco de coinfeção HIV/ <i>Leishmania</i> no Brasil.....	24
Figura 5. Análise da proliferação de linfócitos T de controle não infectado....	34
Figura 6. Estratégia utilizada na análise das subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ de memória central e efetora.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos dos pacientes coinfectados por HIV e <i>Leishmania</i>	30
Tabela 2. Dados clínicos e demográficos dos pacientes infectados por <i>Leishmania</i>	31
Tabela 3. Principais características clínicas e epidemiológicas dos pacientes coinfectado por HIV e <i>Leishmania</i> e dos pacientes infectados apenas por <i>Leishmania</i>	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – *Acquired immunodeficiency syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

ARV – Antiretroviral

CBA – *Cytometric Bead Array* (Ensaio Citométrico de Esfera)

CD – *Cluster of differentiation* (Cluster de diferenciação)

cDNA – *Complementary deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico complementar)

CFSE – *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*

CONEP – Comitê nacional de ética em pesquisa

CTL – *Cytotoxic T lymphocyte* (Linfócito T citotóxico)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTH – *Delayed-type hypersensitivity* (Hipersensibilidade do tipo tardia)

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoabsorvente ligada à enzima)

FITC – *Fluorescein isothiocyanate*

HGRS – Hospital Geral Roberto Santos

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Adquirida)

HUPES – Hospital Universitário Professor Edgar Santos

IFN- γ – Interferon-gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IQR – *Interquartile range* (Variação de interquartil)

IRIS – *Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome* (Síndrome Inflamatória de Reconstituição Imune)

Log – Logaritmo

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial Saúde

PBMC – *Peripheral blood mononuclear cell* (Célula mononuclear do sangue periférico)

PE – *Phycoerythrin*

PECy5 – *Phycoerythrin-Cy5*

PE-Cy-7 – *Phycoerythrin-Cy7*

PHA – *Phytohemagglutinin* (Fitohemaglutinina)

RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

SAB – Soro AB

SFB – Soro Fetal bovino

SLA – *Soluble Leishmania antigens* (Antígeno solúvel de *Leishmania*)

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TCM – *Central memory T-cell* (Linfócito T de memória central)

TEM – *Effector memory T-cell* (Linfócito T de memória efetora)

TGF- β - *Transforming growth factor-beta* (Fator transformado de crescimento-beta)

Th1 – *T helper 1* (T auxiliary 1)

Th2 – *T helper 2* (T auxiliary 2)

TNF- α – *Tumor necrosis factor-alfa* (Fator de necrose tumoral-alfa)

UDI – Usuário de droga injetáveis

UNAIDS - Programa Conjunto das Nações Unidas para a AIDS

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	LEISHMANIOSE.....	13
1.1.1	Epidemiologia.....	13
1.1.2	Imunopatogênese e Apresentação Clínica.....	14
1.2	INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA.....	17
1.2.1	Estrutura do HIV.....	17
1.2.2	Epidemiologia.....	18
1.2.3	Imunopatogênese.....	20
1.3	COINFECÇÃO POR HIV E <i>LEISHMANIA</i>	23
1.3.1	Epidemiologia.....	23
1.3.2	Imunopatogênese.....	25
2	OBJETIVOS.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	DESENHO DO ESTUDO.....	29
3.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	29
3.3	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	29
3.4	OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO.....	32
3.5	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DOS LINFÓCITOS T ESPECÍFICOS.....	32
3.6	AVALIAÇÃO DO ESTÁGIO DE MATURAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4 ⁺	35
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4	CAPÍTULO I – DECREASED OF <i>LEISHMANIA</i>-SPECIFIC MEMORY T-CELLS IN HV/<i>LEISHMANIA</i> CO-INFECTION	

	INDIVIDUALS.....	38
5	CAPÍTULO II – IMMUNE RESPONSE TO <i>LEISHMANIA</i> ANTIGENS IN AN HIV-INFECTED PATIENT WITH MUCOCUTANEOUS LEISHMANIASIS AS A MANIFESTATION OF IRIS: A CASE REPORT.....	48
6	DISCUSSÃO.....	60
7	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	APÊNDICE I – TH1/TH2 CYTOKINE PROFILE IN HIV AND <i>LEISHMANIA</i> CO-INFECTED PATIENTS IN BRZIL.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE

1.1.1 Epidemiologia

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* que afeta várias espécies de mamíferos, incluindo o homem. As formas promastigotas flageladas da *Leishmania* são transmitidas pela fêmea de insetos flebotomíneos da família Psychodidae (*Phlebotomes* e *Lutzomyias*).

A leishmaniose é endêmica em 88 países e por isso considerada uma das principais endemias em grande parte do continente americano, asiático, europeu e africano. Cerca de 12 milhões de pessoas são afetadas pela leishmaniose no mundo e estima-se que, por ano, 1 a 2 milhões de pessoas desenvolvam novos casos da doença (WHO) (2005). Entre os pacientes acometidos, 70.000 morrem por ano (DESJEUX, 2004). Devido a sua importância, a Organização Mundial da Saúde (OMS) a incluiu entre as seis doenças consideradas prioritárias no seu programa de controle (WHO, 2002).

O risco de adquirir a infecção pela *Leishmania* é determinado pela coexistência do inseto transmissor e de reservatórios animais do parasita. Recentes modificações nos fatores de risco de transmissão da leishmaniose contribuem para o aumento do número de casos, como por exemplo, a contínua urbanização, a transmissão doméstica e a coinfeção com HIV (DESJEUX, 2001; LYONS, VEEKEN *et al.*, 2003).

A *Leishmania* causa um amplo espectro de doenças humanas que incluem lesão cutânea que cura espontaneamente, lesões cutâneas localizadas ou disseminadas, lesões mucosas ou difusas e uma doença visceral.

A leishmaniose visceral é uma doença grave, também conhecida como Kalazar, que se não tratada pode levar a morte. É caracterizada por hepatoesplenomegalia, febre, perda de peso e anemia. A maioria dos casos de leishmaniose visceral (90 %) ocorre em áreas rurais pobres de Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil, e a incidência anual é

de 500.000 casos (DESJEUX, 1996). O número de casos de leishmaniose visceral registrados no Brasil entre 2003 e 2009 foi 34.583, distribuídos nas cinco regiões brasileiras. Na região nordeste do país ocorreu à maior parte dos casos (47,5 %) seguida das regiões norte (19,2 %) e sudeste (17,4 %).

A incidência anual de casos de leishmaniose tegumentar é estimada em 1-1.5 milhões de casos. Países como Afeganistão, Argélia, Irã, Iraque, Arábia Saudita, Síria, Brasil e Peru concentram 90 % dos casos (ASHFORD, DESJEUX *et al.*, 1992).

No Brasil, no período entre 1988 e 2009, 26.021 casos de leishmaniose tegumentar foram registrados, cerca de 14 casos por 100.000 habitantes. Nos últimos anos, a epidemia de leishmaniose tegumentar no país tem aumentado e se expandido geograficamente. A região Norte possui o maior número de casos (cerca de 37 %) e com os coeficientes médios mais elevados (66,9 casos por 100.000 habitantes), em segundo e terceiro lugar estão as regiões Centro-oeste (32,6 casos por 100.000 habitantes) e Nordeste (16,1 casos por 100.000 habitantes) (Ministério da Saúde).

1.1.2 Imunopatogenese e Apresentação Clínica

A imunidade celular e a produção de citocinas são os principais mecanismos de defesa do hospedeiro contra a *Leishmania* (PEARSON, SOUSA, 1996). Estudos em modelos experimentais de infecção por *Leishmania* demonstram a dicotomia entre a resposta de células T *helper* 1 (Th1), que promove defesa contra patógenos intracelulares e da resposta do tipo T *helper* 2 (Th2), que está associado a resistência contra patógenos extracelulares e alergias (SCOTT, 1989).

Na infecção por *Leishmania major* em camundongos C57BL/6 foi identificado um aumento da produção de interferon-gama (IFN- γ) por células T específicas para *Leishmania*. Estes camundongos são resistentes à infecção e resolvem a lesão espontaneamente. Por outro lado, os camundongos BALB/C falham em controlar a infecção por *L. major* e desenvolvem lesões progressivas acompanhadas de sintomas sistêmicos. Nestes camundongos é descrito um aumento da produção de interleucina-4 (IL-4) (HEINZEL, SADICK *et al.*, 1989; SACKS, NOBEN-TRAUTH, 2002).

A diferenciação de células Th0 em células com perfil de produção de citocinas do tipo Th1 ou Th2 ocorre após a apresentação dos antígenos às células T CD4⁺ *naive* por células dendríticas. A interação das moléculas coestimulatórias com seus respectivos ligantes em conjunto com a ação das citocinas promovem a diferenciação destas células para células com perfil Th1 ou Th2 (**Figura 1**). Na diferenciação para células Th1, células apresentadoras de antígenos produzem IL-12 que promove a diferenciação para este perfil de resposta, que inclui a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e IL-2. Enquanto a polarização para células do tipo Th2 é mediada pela secreção de IL-4 (SACKS, NOBEN-TRAUTH, 2002). O perfil de resposta Th2 promove a produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 que direciona a resposta imune para a resposta humoral com proliferação de linfócitos B e produção de imunoglobulina G (IgG) e IgE.

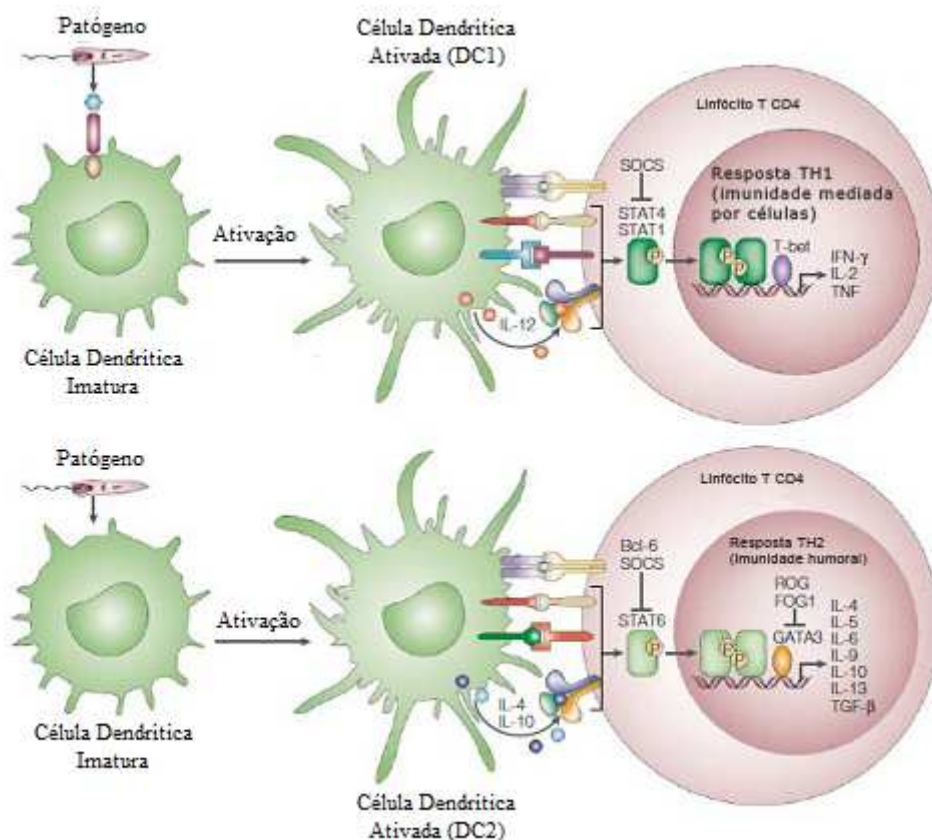


Figura 1. Modelo de diferenciação de células CD4⁺ Th1 e Th2. Adaptado de SACK & NOBEN-TRAUTH, 2002.

O IFN- γ é uma importante citocina envolvida na resposta contra a *Leishmania*, por atuar ativando macrófagos. Nos macrófagos ativados, as espécies reativas de oxigênio (H₂O₂) e os intermediários de nitrogênio (NO) são produzidos, o que resulta na morte intracelular da *Leishmania* (MURRAY, RUBIN *et al.*, 1983).

A dicotomia entre o perfil de resposta do tipo Th1 e Th2, demonstrado nos modelos experimentais, não foi evidenciada nas infecções humanas por *Leishmania*. Contudo, o equilíbrio entre a resposta inflamatória e a resposta regulatória parecer ser importante para o *clearance* da *Leishmania* e para a resolução das lesões (GOMES-SILVA, DE CASSIA BITTAR *et al.*, 2007).

Os sintomas clínicos observados nos pacientes infectados são resultado da associação entre os fatores de virulência do parasita e a resposta imune montada pelo hospedeiro. Infecções subclínicas, que geralmente curam espontaneamente, estão associadas ao desenvolvimento de uma resposta imune celular eficaz e bem regulada (COSTA, VALE *et al.*, 1990).

Pacientes com leishmaniose cutânea apresentam uma ou múltiplas lesões ulceradas, com bordas elevadas e fundo granulomatoso. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) destes pacientes apresentam uma forte resposta proliferativa, elevada produção de IFN- γ e TNF- α e reduzida produção de IL-5 e IL-10 em resposta a antígenos de *Leishmania* (BACELLAR, LESSA *et al.*, 2002). Pacientes com leishmaniose mucosa apresentam lesões na mucosa nasal e orofaríngea com intenso processo inflamatório que pode levar a destruição do septo nasal e aparecimento de lesões desfigurantes. As PBMC destes pacientes proliferam com maior intensidade e produzem altas concentrações de IFN- γ , TNF- α e IL-5 em resposta aos antígenos de *Leishmania*, comparado aos pacientes com leishmaniose cutânea. Além da resposta do tipo Th1 exacerbada e do padrão misto de citocinas Th1 e Th2, estes pacientes apresentam baixas concentrações de IL-10 e fator de transformação de crescimento-beta (TGF- β) (BACELLAR, LESSA *et al.*, 2002; CACERES-DITTMAR, TAPIA *et al.*, 1993; PIRMEZ, YAMAMURA *et al.*, 1993). Embora o TNF- α tenha importante papel no controle do parasita, também atua contribuindo para o dano tecidual e as manifestações exacerbadas encontrada nos pacientes com lesões mucosas (CARVALHO, JOHNSON *et al.*, 1985; RIBEIRO-DE-JESUS, ALMEIDA *et al.*, 1998). Por outro lado, a redução das citocinas responsáveis pelo controle da resposta

imune e da expressão dos receptores de IL-10 provoca o desregulamento da resposta imune (FARIA, GOLLOB *et al.*, 2005).

Outra forma de apresentação clínica é a leishmaniose disseminada. Esta forma apresenta múltiplas lesões acneiformes, papulares ou ulceradas em várias partes do corpo (CARVALHO, PASSOS *et al.*, 2005). A resposta Th1 nestes pacientes, apesar de presente, encontra-se diminuída em comparação aos pacientes com leishmaniose cutânea. Desta forma, a redução na produção de IFN- γ favorece a disseminação do parasita e a multiplicação das lesões (CARVALHO, BARRAL *et al.*, 1994).

As formas mais graves da infecção por *Leishmania*, como a cutânea difusa e a visceral, são associadas ao grande número de parasitas e a menor resposta Th1. A leishmanose difusa é caracterizada por numerosas lesões nodulares disseminadas pelo corpo. Nos pacientes com leishmaniose difusa, a resposta imune mediada por células específica à *Leishmania* é anérgica com ausência de secreção de IFN- γ e elevada produção de IL-4, IL-5 e IL-10 (CACERES-DITTMAR, TAPIA *et al.*, 1993). Da mesma forma, na leishmaniose visceral, os linfócitos são incapazes de proliferar e de produzir IFN- γ em resposta ao estímulo com antígenos de *Leishmania*, e por consequência de ativar macrófagos para eliminar o parasita. Foi descrito que nestes pacientes a reação de hipersensibilidade tardia à *Leishmania* é negativa e as citocinas Th2, IgG e IgE encontram-se elevadas (ATTA, D'OLIVEIRA *et al.*, 1998; CARVALHO, BACELLAR *et al.*, 1988; ZWINGENBERGER, HARMS *et al.*, 1990).

1.2 INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

1.2.1 Estrutura do HIV

O vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), agente etiológico da imunodeficiência humana adquirida (AIDS), é um retrovírus envelopado que pertence à família Retroviridae, gênero *Lentivirus* (BARRE-SINOSSI, CHERMANN *et al.*, 1983; POPOVIC, SARNGADHARAN *et al.*, 1984).

O HIV possui capsídeo viral formado pela proteína p24, o núcleo capsídeo composta por p7 e p9, duas fitas simples de RNA e três enzimas virais: protease, transcriptase reversa e integrase. O envelope viral é composto pela gp120, subunidade de superfície, e pela gp41, subunidade transmembrana (BARRE-SINOUSI, 1996; CHAN, KIM, 1998).

O HIV-1 infecta tipos celulares que expressam a molécula CD4, como linfócitos T, monócitos/macrófagos e células dendríticas. A interação de alta afinidade entre a molécula CD4 e a glicoproteína de superfície do HIV (gp120) inicia a entrada viral na célula alvo e a infecção (KLATZMANN, CHAMPAGNE *et al.*, 1984). A ligação da gp120 ao CD4 e aos coreceptores virais (CCR5 e CXCR4) desencadeia modificações tridimensionais que permitem a entrada do capsídeo no citoplasma e a liberação do envelope, das enzimas e do genoma virais (HELSETH, OLSHEVSKY *et al.*, 1990; WU, GERARD *et al.*, 1996). Em seguida, a transcriptase reversa é ativada iniciando a transcrição das fitas de RNA em cDNA, que é integrado ao genoma da célula hospedeira formando o próvirus, o qual produz as proteínas virais quando a célula é ativada.

1.2.2 Epidemiologia

Segundo estimativas da OMS e do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), em 2009, 33,3 milhões de pessoas eram portadoras do HIV (**Figura 2**). O crescimento mundial da epidemia de AIDS parece tender a estabilização, pois o número anual de novas infecções e a mortalidade relacionada à AIDS tem diminuído desde 1990. Em 2009, foi estimado em 2,6 milhões de novos casos de infecção por HIV e 1,8 milhões de morte relacionada à AIDS. A mortalidade tem reduzido desde 2004, quando o número de mortes era de 2,1 milhões, devido ao maior acesso à terapia antiretroviral (ARV) e a melhora no serviço de saúde para as pessoas que vivem com AIDS.

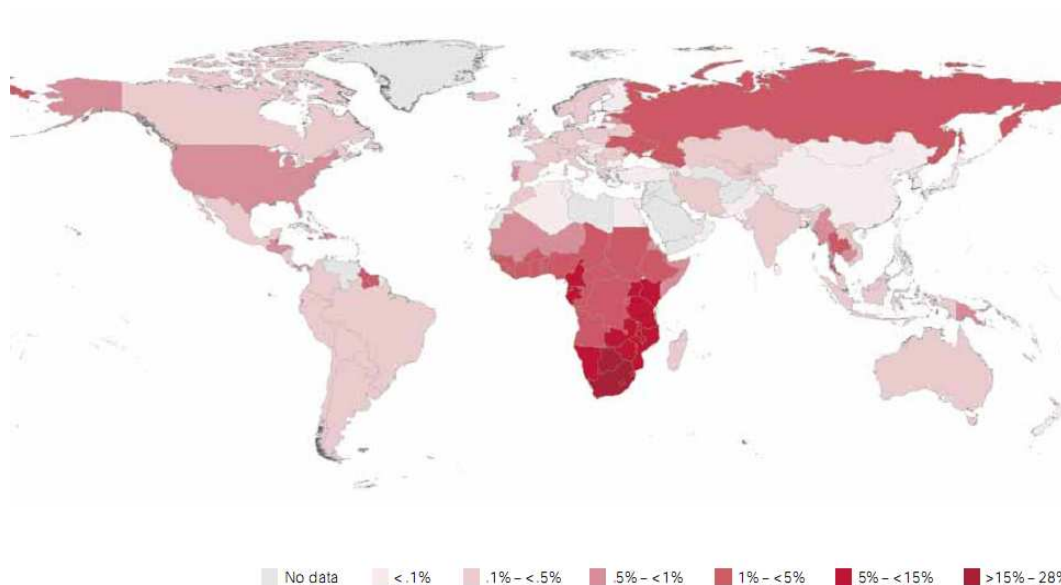


Figura 2. Prevalência global do HIV em 2009. 2010 GLOBAL REPORT/UNAIDS.

Mais de 95 % das infecções causadas pelo HIV concentram-se em países em desenvolvimento e 68 % do total ocorrem na África subsaariana. Assim como o maior número de novas infecções, que foi estimada em 1,8 milhões em 2009 (UNAIDS, 2010).

No Brasil, o primeiro caso conhecido de AIDS foi notificado em São Paulo, na década de 1980. Segundo o Ministério da Saúde (MS), foram notificados 592.914 casos da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) entre 1980 e 2010. Na população brasileira entre 15 e 49 anos, a taxa de prevalência da infecção é de 0,6 %.

Inicialmente, homossexuais, usuários de drogas injetáveis e indivíduos transfundidos com hemocomponentes representavam os principais grupos afetados pela epidemia HIV/AIDS. Nos últimos anos, o perfil da epidemia tem se alterado, aumentando a prevalência de AIDS em heterossexuais, em mulheres e na camada da população com menores índices sociodemográficos, além de estar alcançando cidades de médio e pequeno porte, no interior do país. Além disso, houve uma redução na mortalidade devido ao acesso livre e universal dos pacientes com AIDS ao tratamento antiretroviral, através da distribuição destas drogas pelo sistema público de saúde do país (Ministério da Saúde).

1.2.3 Imunopatogênese

A infecção causada pelo HIV é caracterizada pela perda progressiva de linfócitos T CD4⁺, que conduz ao desenvolvimento de infecções oportunistas (CLERICI, STOCKS *et al.*, 1989).

O curso clínico de infecção pelo HIV inclui três estágios: infecção primária, latência clínica e AIDS. Nas primeiras semanas após a infecção, ocorre o aparecimento de sintomas agudos e inespecíficos, com extensiva viremia e elevado número de linfócitos T CD4⁺ infectados. O início da resposta imune anti-HIV, (presença de anticorpos e de linfócitos T citotóxicos) coincide com a diminuição da viremia, conduzindo a uma fase de latência clínica que apresenta baixas quantidades circulantes de vírus e de células infectadas. Neste período, que varia de 8 a 10 anos, continua a ocorrer replicação viral, sobretudo nos tecidos linfóides, e gradualmente a contagem de linfócitos T CD4⁺ reduz. A fase do estabelecimento da AIDS caracteriza-se pela diminuição acentuada da proporção de linfócitos T CD4⁺, aumento da carga viral e aparecimento de infecções oportunistas (COFFIN, 1995).

A natureza complexa da infecção pelo HIV-1 é resultado da interação de múltiplos fatores como a continua replicação viral, a ativação persistente do sistema imune e a desregulação da produção de citocinas. Durante a infecção primária é detectado o início da resposta imune celular e humoral específica ao HIV, entretanto a replicação viral não é contida de forma apropriada, o que permite a continua replicação e a progressão para uma infecção crônica, resultando em uma imunossupressão grave (FAUCI, PANTALEO *et al.*, 1996; PANTALEO, FAUCI, 1996).

Na infecção primária, são identificados elevados títulos de anticorpos específicos ao HIV com a atividade neutralizante comprometida (MOORE, CAO *et al.*, 1994; TINDALL, COOPER, 1991). A disseminação inicial do vírus sugere que os anticorpos não são protetores, entretanto podem ser um importante mecanismo para remover o número elevado de partículas virais da circulação (PANTALEO, FAUCI, 1996). Também é possível observar a atividade supressora mediada por linfócitos T CD8⁺, que atua contribuindo no controle da propagação do vírus e da progressão da doença (MACKEWICZ, ORTEGA *et al.*, 1991). Por outro lado, a resposta imune

mediada por células encontra-se diminuída devido à depleção dos linfócitos T CD4⁺ ou pela supressão mediada pelos fatores solúveis e citocinas (PANTALEO, FAUCI, 1996).

A diminuição de linfócitos T CD4⁺ durante a infecção pelo HIV compromete a capacidade funcional da resposta imune. Inicialmente, a resposta específica aos antígenos de memória é diminuída, posteriormente também é perdida a resposta aos aloantígenos e aos mitógenos (CLERICI, STOCKS *et al.*, 1989; GRUTERS, TERPSTRA *et al.*, 1990). A redução dos linfócitos T CD4⁺ ocorre por diversos mecanismos. O contínuo brotamento do vírus em células infectadas causa rupturas na membrana e aumento da permeabilidade, o que resulta na morte celular. Em células infectadas, a apoptose é um dos mecanismos que mais contribui para a destruição de células e é diretamente correlacionado à progressão da doença. Além disso, os linfócitos T citotóxicos (CTL) específicos para o HIV reconhecem células infectadas e o contato célula-célula conduz a lise da célula infectada (PARANJAPE, 2005).

No curso da infecção pelo HIV, foi descrito o aumento da produção das citocinas IL-6, TNF- α e IL-10. Em contraste, as citocinas IL-2 e IL-4 foram raramente encontradas nos indivíduos infectados por HIV. O aumento da produção de determinadas citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , contribuem para a progressão da infecção pelo HIV, pois elas são capazes de aumentar a expressão viral (FOLKS, CLOUSE *et al.*, 1989; GRAZIOSI, PANTALEO *et al.*, 1994). Estas citocinas podem modular a replicação do HIV nos linfócitos T e nos macrófagos, contribuindo assim para a manutenção dos níveis constantes de expressão viral, principalmente nos tecidos linfóides.

A resposta imune específica para o HIV, principalmente a ativação do sistema imune são paradoxalmente mecanismos que propagam a infecção (PANTALEO, FAUCI, 1996). O aumento da expressão das moléculas de ativação, CD38 e HLA-DR, nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, por exemplo, é correlacionado com a redução do número total de linfócitos T CD4⁺ (BENITO, ZABAY *et al.*, 1997).

Foi observado que a função T *helper* dos pacientes infectados pelo HIV após estímulo com antígenos de memória conduz a um aumento de IL-4, o que está associado à progressão para a AIDS (CLERICI, HAKIM *et al.*, 1993). Assim como, o aumento da subpopulação CD45RO⁺ e a redução na subpopulação CD45RA⁺ nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ estão envolvidos no avanço da infecção (BENITO, ZABAY *et al.*, 1997).

Estudos realizados em animais e em humanos têm evidenciado uma grande heterogeneidade nas células T CD4⁺. Múltiplos fenótipos e um grande espectro de funções têm sido descritos em diferentes infecções virais (APPAY, DUNBAR *et al.*, 2002; ROMAN, MILLER *et al.*, 2002). As células T de memória são classificadas em subpopulações de acordo com a expressão de CCR7, um receptor de quimiocina envolvido no *homing* destes para os linfonodos e de CD45RA, uma molécula de membrana envolvida na ativação de células e da produção de citocinas. As células *naive* expressam CD45RA e CCR7. As células de memória central expressam CCR7, mas não expressam CD45RA e produzem IL-2. As células de memória efetora não expressam CD45RA e CCR7 e produzem IFN- γ (SALLUSTO, LENIG *et al.*, 1999). Os linfócitos T efetores são perdidos na ausência do parasita, enquanto que os linfócitos T de memória persistem. Em uma infecção secundária, portanto, os linfócitos T de memória central tornam-se efetores e conferem proteção (HARARI, VALLELIAN *et al.*, 2005).

A heterogeneidade funcional e fenotípica das células de memória é influenciada por diferentes condições de exposição e de persistência do antígeno. Uma resposta com predomínio de linfócitos T CD4⁺ de memória, que produzem IL-2 e/ou IL-2/IFN- γ , está associada ao controle da infecção, como por exemplo, na infecção pelo HIV em indivíduos com progressão lenta. Por outro lado, o predomínio de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ está associado à persistência de altos níveis de antígenos, como em indivíduos com infecção crônica e progressiva pelo HIV-1 (HARARI, VALLELIAN *et al.*, 2005).

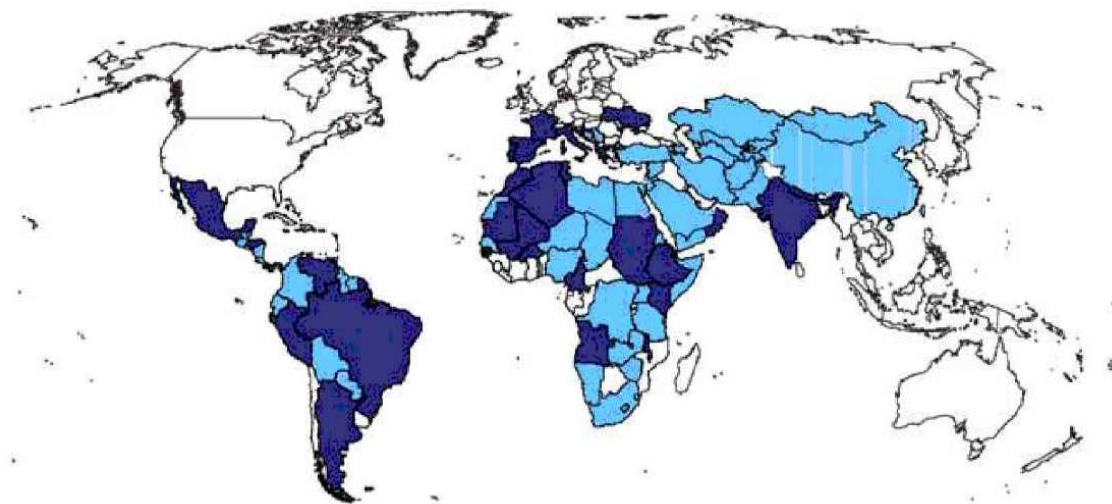
A introdução da terapia ARV diminuiu o impacto da mortalidade e da morbidade dos pacientes com HIV/AIDS ao levar a recuperação do sistema imune e conseqüentemente à redução das infecções oportunistas. Além disso, já nas primeiras semanas de tratamento é possível identificar a redução de 90 % da concentração de RNA do HIV circulante (PAKKER, ROOS *et al.*, 1997). Durante a recuperação do sistema imune, ocorre o aumento da contagem dos linfócitos T CD4⁺, devido ao aumento inicial da recirculação da subpopulação de memória, a redução da ativação do sistema imune seguida da recuperação da resposta aos antígenos de memória e por fim ao aumento de linfócitos T CD4⁺ *naive* (AUTRAN, CARCELAIN *et al.*, 1997).

1.3 COINFEÇÃO HIV/*LEISHMANIA*

1.3.1 Epidemiologia

O primeiro caso de leishmaniose associado ao vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) foi relatado em 1985, na Europa. Posteriormente, o número de casos relatados no sudoeste europeu aumentou rapidamente (WHO, 2007) (CRUZ, NIETO *et al.*, 2006), devido à sobreposição da distribuição geográfica dos casos de leishmaniose visceral e de AIDS. A co-existência das duas epidemias é resultado da disseminação da pandemia da AIDS para áreas rurais e da leishmaniose para áreas periurbanas (DESJEUX, ALVAR, 2003).

Atualmente, 35 países já relataram casos de coinfeção (DESJEUX, ALVAR, 2003) (**Figura 3**) e a *Leishmania* é considerada um patógeno oportunista em indivíduos infectados pelo HIV (ALVAR, CANAVATE *et al.*, 1997; LOPEZ-VELEZ, 2003; OLIVIER, BADARO *et al.*, 2003).



Distribuição mundial da leishmaniose (■) os países que reportaram coinfeção por HIV/Leishmania (■), 2001.

Figura 3. Distribuição mundial da leishmaniose e os países que reportaram casos de coinfeção HIV/*Leishmania* (Adaptação de DESJEUX, ALVAR, 2003).

Na Europa, 70 % das leishmanioses viscerais, em adultos, estão relacionadas com HIV/AIDS. Entre os casos europeus, 90 % são relatados na França, Itália, Portugal e Espanha (WHO, 2000). A população em maior risco de coinfeção HIV/*Leishmania* é a o grupo de usuários de drogas injetáveis (UDI), que representam 70 % dos casos conhecidos (LOPEZ-VELEZ, 2003). É provável que os números sejam ainda maiores em vários países da África e Ásia, que possuem falhas no diagnóstico e tem deficiências no sistema de informação.

Nas Américas, a maioria dos relatos de coinfeção tem origem no Brasil, país que possui bom sistema de vigilância epidemiológica nas duas doenças (WHO, 2007). No Brasil, 37 % dos casos relatados de coinfeção por HIV/*Leishmania* apresentaram a forma visceral da leishmaniose e 63 % a forma tegumentar, sendo a maioria destes na apresentação mucocutânea ou mucosa (43 %). Nesta população, a maior parte dos casos (18 %) ocorreu no grupo de indivíduos com via de exposição heterossexual para o HIV (RABELLO, ORSINI *et al.*, 2003).

A sobreposição da infecção por HIV e pela *Leishmania* ocorre em diversas áreas no Brasil. Nos últimos anos, as áreas de risco para a coinfeção HIV/*Leishmania* tem se ampliado devido às modificações no perfil epidemiológico da infecção pelo HIV, como o aumento da prevalência de AIDS em homens heterossexuais, em mulheres e na camada da população com menores níveis socioeconômicos e nas cidades de médio e pequeno porte, no interior do país (Ministério da Saúde) (**Figura 4**).

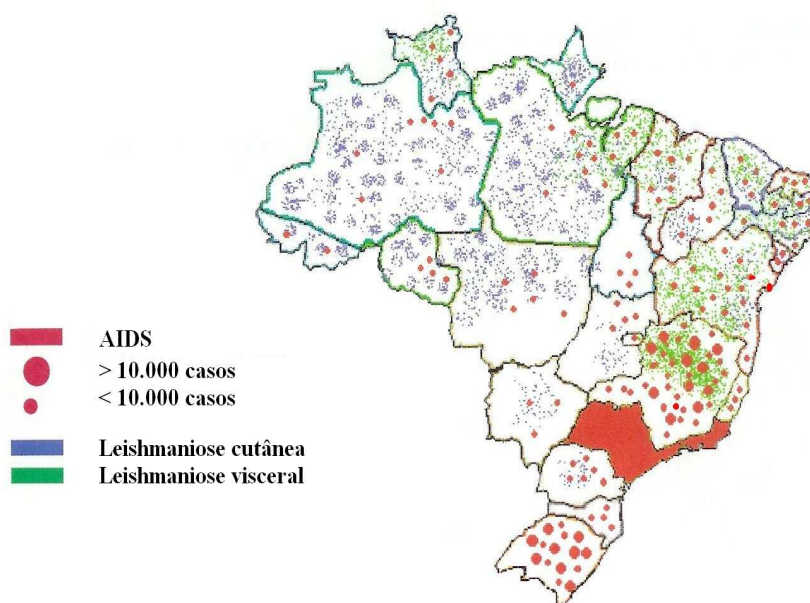


Figura 4. Áreas de risco de coinfeção HIV/*Leishmania* no Brasil.

Alguns pacientes após o início do tratamento ARV apresentam uma deterioração clínica que coincide com a redução da carga viral e o aumento de linfócitos T CD4⁺. Os pacientes exibem uma síndrome inflamatória de recuperação imune (IRIS) caracterizada por uma resposta inflamatória contra antígenos não infecciosos ou infecciosos introduzidos antes do início da terapia ARV. A IRIS consiste de várias alterações imunológicas que parecem ser resultado de disfunções na restauração da resposta imune específica e/ou da regulação imune. Contudo, a imunopatogenese da IRIS ainda não é bem compreendida. A maioria dos casos de IRIS é associada com: *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis*, cytomegalovirus e herpes zoster (FRENCH, 2009; SHELBURNE, HAMILL *et al.*, 2002). Recentemente, foram descritos casos de leishmaniose associados a IRIS (CHRUSCIAK-TALHARI, RIBEIRO-RODRIGUES *et al.*, 2009; POSADA-VERGARA, LINDOSO *et al.*, 2005; SINHA, FERNANDEZ *et al.*, 2008).

1.3.2 Imunopatogênese

A leishmaniose associada à infecção pelo HIV apresenta diversas características distintas: disseminação do parasita via sistema retículo endotelial sem envolvimento visceral, causando leishmaniose cutânea difusa; localizações atípicas como consequência da disseminação parasitária e deficiência na imunidade celular; progressão crônica; aumento da recidiva; e menor resposta terapêutica (CRUZ, NIETO *et al.*, 2006).

No Brasil, a forma tegumentar é mais frequente. Além de quadros clássicos de leishmaniose tegumentar, apresenta manifestações atípicas, como o aumento de lesões cutâneas disseminadas e mucosas. Principalmente nos indivíduos com imunodepressão grave, contagem de linfócitos T CD4⁺ < 200 células/mm³ (LINDOSO, BARBOSA *et al.*, 2009; MATTOS, CAIZA *et al.*, 1998). Tendo em vista a redução na resposta Th1 presente em pacientes com HIV, ainda não estão esclarecidos os mecanismos imunológicos envolvidos nas lesões de leishmaniose nos pacientes infectados pelo HIV, principalmente os relacionados com dano mucoso.

Os macrófagos têm sido reconhecidos como células importantes na patogênese da infecção, pois são alvos primários do vírus nos linfonodos, nos pulmões e no sistema nervoso central e compõem reservatórios importantes do vírus (DALGLEISH, BEVERLEY *et al.*, 1984; MELTZER, SKILLMAN *et al.*, 1990). Por sua vez, a *Leishmania* também infecta e se multiplica no interior dos macrófagos (OLIVIER, BADARO *et al.*, 2003). A presença de ambos os microorganismos no mesmo tipo celular pode ter implicações importantes na coinfeção, como por exemplo, na progressão infecção pela *Leishmania* (TREMBLAY, OLIVIER, *et al.*, 1996).

Foi demonstrado que promastigotas da *Leishmania infantum* podem induzir a expressão do HIV em uma linhagem de monócitos infectados. A expressão é mediada pela glicoproteína, lipofosfoglicano, componente básico da membrana do parasita, que atua promovendo a secreção de TNF- α , citocina conhecida por aumentar a expressão do HIV (BERNIER, TURCO *et al.*, 1995; FOLKS, CLOUSE *et al.*, 1989). Além disso, tem sido observado que nos pacientes coinfectados ocorre um aumento de linfócitos expressando a molécula CCR5, o que pode favorecer uma rápida progressão para AIDS (NIGRO, RIZZO *et al.*, 2007; OLIVIER, BADARO *et al.*, 2003).

Elevadas taxas de resultados falsos negativos na sorologia para *Leishmania* foram observados nos pacientes coinfectados por *HIV/Leishmania* com leishmaniose visceral. Tal observação pode está correlacionada com a redução dos linfócitos T CD4⁺ e com a perda da capacidade dos linfócitos de reconhecer antígenos de *Leishmania* e de estimular linfócitos B (CRUZ, NIETO *et al.*, 2006; MEDRANO, CANAVATE *et al.*, 1998).

Nos pacientes coinfectados com *HIV/Leishmania* que apresentam a forma clínica de leishmaniose visceral ocorre uma aumento de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) quando comparado com pacientes com apenas leishmaniose visceral (CACOPARDO, NIGRO *et al.*, 1996; NIGRO, CACOPARDO *et al.*, 1999).

Possivelmente, a funcionalidade das células de memória também é afetada pela coinfeção por *HIV/Leishmania*, pois em vários pacientes com leishmaniose mucocutânea infectados por HIV o resultado da reação de hipersensibilidade tardia (DTH) para antígeno de *Leishmania* é negativo (BADARO, 1997).

A imunossupressão causada pelo HIV prejudica a resposta celular específica. Foi observada a ausência de resposta linfoproliferativa aos antígenos de *Leishmania* em um paciente coinfectado por *HIV/Leishmania* com leishmaniose cutânea (DA-CRUZ,

MACHADO *et al.*, 1992). A inibição da resposta proliferativa pode favorecer a disseminação do parasita para locais atípicos e a parasitemia. Além disso, a ausência da produção do IFN- γ também pode contribuir com a parasitemia e as apresentações clínicas disseminadas e de maior gravidade (OLIVIER, BADARO *et al.*, 2003; WOLDAY, AKUFFO *et al.*, 1994).

A introdução da terapia antiretroviral para o HIV modificou a história natural da infecção e das doenças oportunistas (KAPLAN, HANSON *et al.*, 2000; MOCROFT, VELLA *et al.*, 1998). O número de casos de coinfeção HIV/*Leishmania* nos países da Europa diminuiu (LOPEZ-VELEZ, CASADO *et al.*, 2001), contudo, por causa do aumento da coexistência das duas doenças, a coinfeção está atingindo os países que são os maiores focos endêmicos da leishmaniose. Os pacientes coinfectados que recebem a terapia ARV apresentaram melhor taxa de sobrevivência e redução do risco de recidivas do que os pacientes que não fazem o tratamento (CASADO, LOPEZ-VELEZ *et al.*, 2001; PINTADO, MARTIN-RABADAN *et al.*, 2001). É provável que a restauração da resposta imune e a diminuição da carga viral possibilitem o melhor controle da infecção pela *Leishmania* (LOPEZ-VELEZ, CASADO *et al.*, 2001). Entretanto, foi determinado que entre 38 a 70 % dos pacientes coinfectados recidivam em 24 meses após o tratamento anti-*Leishmania*. As recidivas ocorrem independentemente da contagem de linfócitos T CD4⁺ e da carga viral (CASADO, LOPEZ-VELEZ *et al.*, 2001; LOPEZ-VELEZ, 2003).

Os mecanismos imunopatogênicos pelos quais a *Leishmania* e o HIV interagem ainda não estão bem estabelecidos. Assim como, não está definido de que forma a infecção pelo HIV compromete a resposta imune específica à *Leishmania* nos pacientes com leishmaniose cutânea. Desta forma, compreender as alterações imunológicas encontradas nos pacientes coinfectados por HIV e *Leishmania* é importante para identificar estratégias de tratamento para reduzir a morbidade relacionada à leishmaniose nestes indivíduos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta imune celular dos pacientes coinfectados por HIV/*Leishmania*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar a resposta linfoproliferativa das células mononucleares do sangue periférico frente aos antígenos de *Leishmania*;
- 2 Avaliar o estágio de maturação dos linfócitos T CD4⁺ específicos para *Leishmania*;
- 3 Avaliar a restauração da resposta imune específica para os antígenos de *Leishmania* após o tratamento para leishmaniose.

3 MATERIAL E METÓDOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo de corte transversal.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Trata-se de uma amostra de conveniência. Participaram do estudo 20 pacientes divididos em dois grupos: (1) 8 pacientes coinfectados por HIV e *Leishmania* (**Tabela 1**), (2) 12 pacientes com infecção ativa confirmada de *Leishmania* e com sorologia negativa para o HIV (**Tabela 2**). Todos os pacientes infectados por *Leishmania* apresentavam como forma clínica a leishmaniose cutânea. Foi incluído, igualmente, um grupo controle de 10 indivíduos não infectados.

Os critérios de inclusão para o grupo leishmaniose foram: intradermoreação de Montenegro com induração > 5 mm, evidência histopatológica de *Leishmania* no tecido ou cultura positiva para *Leishmania spp.* no tecido ou sangue ou sorologia (ELISA) positiva para *Leishmania*.

Os pacientes foram selecionados por busca ativa no Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES) e no Hospital Geral Roberto Santos (HGRS), localizados em Salvador, Bahia, Brasil.

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos dos pacientes coinfetados por HIV e *Leishmania*

Pacientes	Gênero	Idade (Anos)	Procedência	Forma Clínica	Linfócitos T CD4⁺ (Células/mm³)	Carga viral (Log)
HIV/Leish 03	F	42	Valença	Mucocutânea ativa	93	1,9
HIV/Leish 05	F	22	São Sebastião	Cutânea ativa	291	5,4
HIV/Leish 06	M	36	Gandú	Cutânea tratada	165	5,2
HIV/Leish 08	F	62	Cachoeira	Cutânea Disseminada tratada	415	3,4
HIV/Leish 09	M	59	Teolândia	Cutânea ativa	78	5,0
HIV/Leish 12	M	36	Dias D´avila	Cutânea ativa	615	1,9
HIV/Leish 13	M	36	Mutuípe	Cutânea ativa	104	5,0
HIV/Leish 14	M	25	Corte de Pedra	Mucocutânea ativa	241	4,6

NI: Não informado; F=Feminino; M=Masculino

Tabela 2. Dados clínicos e demográficos dos pacientes infectados por *Leishmania*

Pacientes	Gênero	Idade (anos)	Procedência	Forma Clínica
Leish 21	M	24	NI	Cutânea disseminada
Leish 22	M	52	NI	Cutânea
Leish 24	M	69	Piritiba	Mucocutânea
Leish 27	M	34	NI	Mucosa
Leish 28	M	37	Ilhéus	Cutânea
Leish 31	M	21	NI	Cutânea
Leish 32	F	22	NI	Cutânea
Leish 33	M	66	Simões Filho	Cutânea
Leish 35	M	63	NI	Cutânea
Leish 36	M	27	Salvador	Cutânea
Leish 37	M	76	NI	Cutânea
Leish 38	F	38	NI	Mucocutânea

NI: Não informado; F=Feminino; M=Masculino.

A contagem de linfócitos T CD4⁺ dos pacientes coinfetados por HIV e *Leishmania* (241 células/mm³, IQR 96-384 células/mm³) foi significativamente menor comparada à contagem dos linfócitos T CD4⁺ dos pacientes infectados por *Leishmania* (784 células/mm³, IQR 599-1477 células/mm³) (p=0.003, teste Mann-Whitney). A mediana da carga viral dos pacientes coinfetados foi de 4.8 log cópias/mL (IQR 2.3-5.1 log cópias/mL). Não houve diferença em relação à mediana da idade dos pacientes coinfetados por HIV e *Leishmania* em comparação com a mediana da idade dos pacientes infectados apenas por *Leishmania* (**Tabela 3**).

Tabela 3: Principais características clínicas e epidemiológicas dos pacientes coinfestado por HIV e *Leishmania* e dos pacientes infectados apenas por *Leishmania*

Grupo (n)	Idade (anos)	Gênero masculino (%)	Linfócitos T CD4⁺ (células/mm³)	Carga Viral (log)
Coinfectado (n=8)	38 (22–62)	67	241 (96-384)**	4,8 (2,3–5,1)
Leishmaniose (n=12)	44 (21–76)	83	784 (599-1477)	ND

ND: Não determinado. Os dados sobre idade são apresentados em média e os sobre contagem de linfócitos T CD4⁺ e carga viral são apresentados em mediana e intervalo interquartil (IQR). As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas pelo teste Mann-Whitney, $p < 0,05$.
 **: Diferença estatística significativa ($p = 0,003$).

3.4 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

Após a assinatura do TCLE, foram coletados, de cada indivíduo, 20 mL de sangue em tubos contendo heparina. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). As células foram criopreservadas em solução contendo soro fetal bovino e 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento das análises.

3.5 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DOS LINFÓCITOS T ESPECÍFICOS

As PBMC foram descongeladas, ressuspensas na concentração de 1×10^6 células por 1 mL de meio RPMI-1640 (Gibco, New York, USA) suplementado com L-glutamina, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) e 10 % de soro fetal bovino (SFB) e incubadas *overnight*, à 37 °C, com 5 % de CO₂. A amostra foi considerada satisfatória se a viabilidade celular era superior a 85 %. Para avaliar a resposta proliferativa, as PBMC foram marcadas com 1,5 μM de *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE, Molecular Probes,

Eugene, OR, EUA). A marcação com CFSE foi realizada conforme os procedimentos descritos pelo fabricante. Em seguida, as PBMC foram cultivadas em tubos estéreis com meio RPMI-1640 completo, suplementado com 10 % de soro AB (SAB), por 5 dias, a 37 °C com 5 % de CO₂. O meio de cultura foi trocado no terceiro dia de cultivo. As condições de cultivo foram as seguintes: 1) meio de cultura com 10 µg/mL de antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), 2) meio de cultura com 2 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA) e 3) meio de cultura suplementado com 1 µg/mL de IL-2.

Para avaliar a proliferação na subpopulações de linfócitos T, após a cultura, as PBMC foram lavadas com PBS, e os sítios inespecíficos foram bloqueados com SFB antes da incubação com anticorpos monoclonais anti-CD4^{PE} (Becton Dickinson Pharmingen, San Jose, CA, EUA) e anti-CD8^{PECy5} (eBioscience, San Diego, CA, USA). Em seguida, as PBMC foram fixadas com PBS-formaldeído à 1% e adquiridas no FACS Aria (Becton Dickinson, CA, USA). A proliferação foi avaliada com o auxílio do *software* para análises de dados de citometria, FlowJo™ (versão 7.6, Tree Star, Inc. 1997 - 2009) (**Figura 5**).

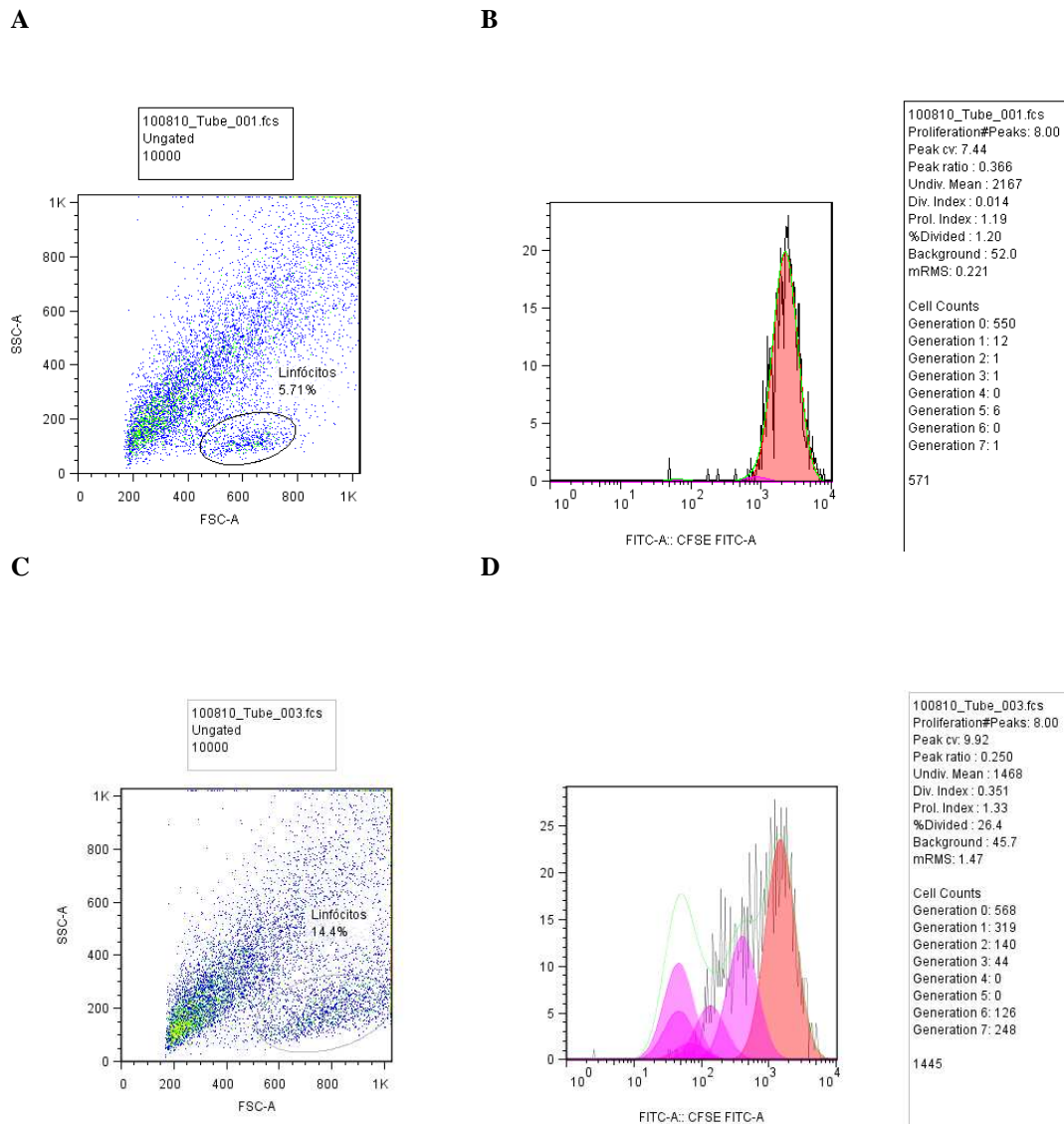


Figura 5. Proliferação dos linfócitos T de um indivíduo controle não infectado. Proliferação na ausência de estimulação antigênica. As PBMC marcadas com CFSE foram incubadas por cinco dias em meio RPMI completo suplementado com soro AB na presença de apenas 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IL-2 ou 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fitohemaglutinina (PHA). Após a cultura as PBMC foram adquiridas no FACSaria e a intensidade de proliferação foi avaliada no software FlowJo. A e C: Seleção de linfócitos por tamanho e granulosidade. B: Exemplo da curva gerada pela análise das PBMC marcadas com CFSE que não proliferam. D: Exemplo da curva gerada pela análise das PBMC marcadas com CFSE com cinco picos de proliferação, cada um representa uma ciclo celular.

A intensidade de proliferação foi avaliada através índice de divisão celular, que corresponde ao número médio de divisões de uma célula (ÂNGULO, FULCHER, 1998). Para determinar o ponto de corte correspondente a proliferação, as PBMC de indivíduos não

infectados foram cultivadas em meio RPMI-1640 completo, suplementado com 10 % de SAB, e incubados a 37 °C com 5 % de CO₂ e 1 UI/mL de IL-2 humana. O meio de cultura foi trocado no terceiro dia de cultivo. Foi considerado como ponto de corte para definir proliferação dos linfócitos T CD4⁺ 0,06, e para os linfócitos T CD8⁺ 0,09.

3.6 AVALIAÇÃO DO ESTÁGIO DE MATURAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4⁺ EM RESPOSTA AO SLA

A frequência de células T CD4⁺ de memória central e efetora foi avaliada através por citometria de fluxo a quatro cores. As PBMC descongeladas foram ressuspensas na concentração de 1x10⁶ células por 1 mL de meio RPMI-1640 completo, suplementado com 10 % SFB na presença de anti-CD28 não marcado (0,5 µg/mL). As PBMC foram cultivadas, em tubos estéreis, por 18 h, a 37 °C com 5 % de CO₂ nas seguintes condições: 1) meio de cultura com 10 µg/mL de SLA; 2) meio de cultura com 2 µg/mL de PHA; e 3) meio de cultura suplementado com 1 µL/mL de IL-2.

Após cultura, as PBMC foram lavadas com PBS e foi adicionado SFB para o bloqueio de sítios inespecíficos por 15 minutos. As PBMC foram incubadas, por 20 minutos, com os anticorpos monoclonais: anti-CD4-FITC, anti-CD45RA-PE, anti-CD62L-PE-Cy-5 e anti-CCR7-PE-Cy-7 (todos da Becton Dickinson Pharmingen, San Jose, CA, EUA). Em seguida, as PBMC foram fixadas com 300 µL de PBS-formaldeído a 1% e adquiridas no FACSaria. As análises da aquisição foram realizadas no *software* FlowjoTM.

Foram consideradas como linfócitos T CD4⁺ de memória central (TCM) as células que expressavam CD62L e CCR7 e na ausência de expressão de CD45RA, e de memória efetora (TEM) as células que não expressavam os marcadores: CD45RA, CD62L e CCR7. A estratégia utilizada na análise dos fenótipos está apresentada na **Figura 6**.

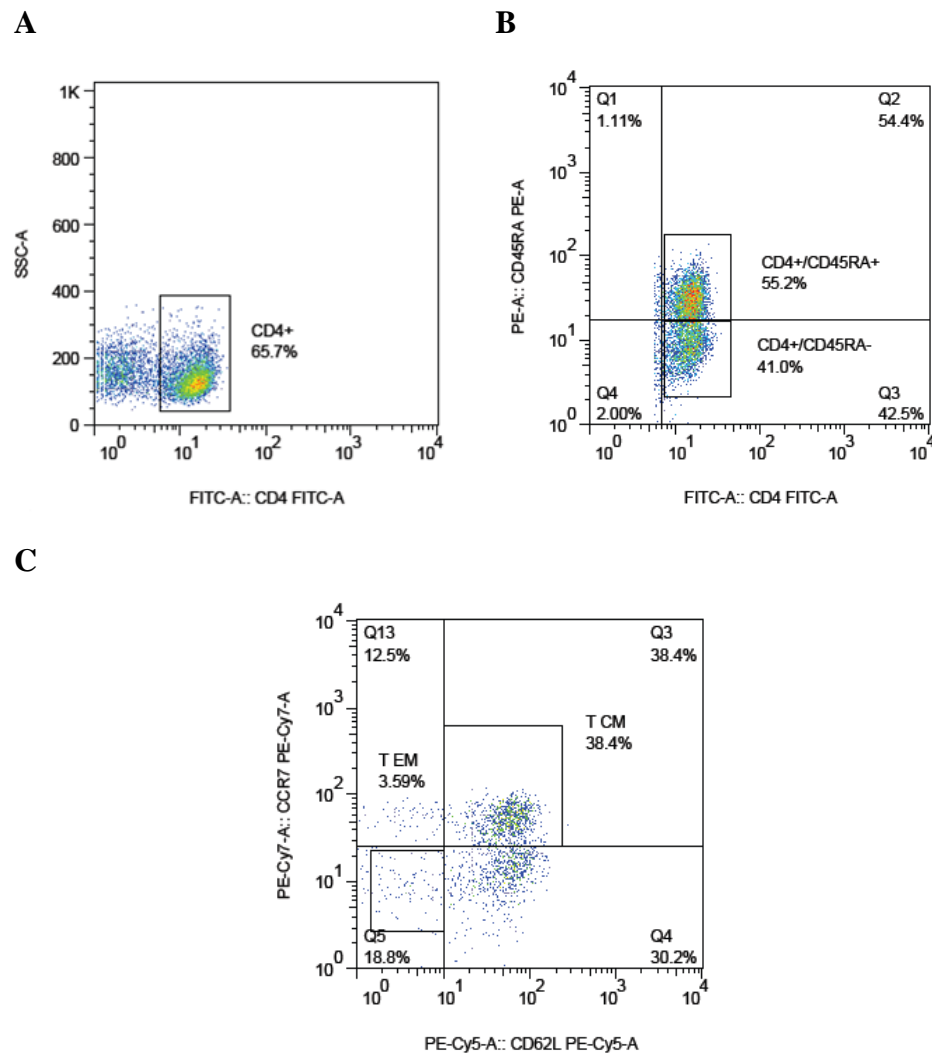


Figura 6. Estratégia utilizada na análise das subpopulações de linfócitos T CD4⁺. As PBMC de um paciente infectado por *Leishmania* foram incubadas por 18 horas com RPMI completo suplementado com soro fetal bovino na presença de anti-CD28 e antígeno solúvel de *Leishmania*. Após a cultura, as PBMC foram marcadas com anti-CD4-FITC, anti-CD45RA-PE, anti-CD62L-PE-Cy-5 e anti-CCR7-PE-Cy-7 e adquiridas no FACSaria. As análises de citometria de fluxo foram realizadas no software FlowJo. A população de linfócitos foi separada do PBMC total pelo tamanho e granulosidade. Na população de linfócitos foi realizado um *gate* nas células CD4⁺ (A). No *gate* de linfócitos CD4⁺ foi separada a população CD45RA⁺ (B, Q2) e a população CD45RA⁻ (B, Q3). Na subpopulação de linfócitos CD4⁺CD45RA⁻ foi avaliada a expressão de CCR7 e de CD62L. A subpopulação de células que expressavam duplamente o CCR7 e o CD62L (C, Q3) foi considerada como de linfócitos CD4⁺ de memória central (TCM) e a subpopulação que não expressava esses marcadores foi considerada com linfócitos CD4⁺ de memória efetora (C, Q5).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA). As variáveis com distribuição não-paramétrica foram expressas em mediana e intervalo interquartil (IQR). Para determinar a diferença estatística entre os grupos dos indivíduos estudados, foi utilizado o teste Mann-Whitney e o Exato de Fisher. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

4 CAPITULO I

O resultado da avaliação da resposta linfoproliferativa aos antígenos de *Leishmania* e do perfil de células de memória específicas à *Leishmania* nos pacientes coinfectados por HIV e *Leishmania* será publicado artigo intitulado: *Decreased of Leishmania-specific memory CD4⁺ T-cells in active tegumentar leishmaniasis in AIDS patients*. Assim como a avaliação da recuperação da resposta imune específica a *Leishmania* após o tratamento para leishmaniose.

4.1 DECREASED OF *LEISHMANIA*-SPECIFIC MEMORY CD4⁺ T-CELLS IN ACTIVE TEGUMENTARY LEISHMANIASIS IN AIDS PATIENTS.

Luana Leandro Gois¹, Sanjay Mehta³, Maria Zilma Andrade Rodrigues¹, Robert T. Schooley³, Roberto Badaró^{2,3} and Maria Fernanda Rios Grassi¹.

1- Oswaldo Cruz Foundation- FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brazil

2- Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

3- University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA

Key words: *Leishmania*, HIV, co-infection, memory CD4⁺ T-cells.

Introduction

Over the past decade, the extension of the HIV-1 epidemic to areas in which *Leishmania* infections are endemic has greatly increased the pool of individuals at risk for severe clinical manifestations of *Leishmania* infection. In particular, Leishmaniasis and HIV overlap in several sub-tropical and tropical regions around the world, including the Mediterranean area of Europe, Brazil and India (22). In Brazil, the predominant clinical form found in HIV/*Leishmania* co-infection patients is the tegumentary disease.

Mucosal and mucocutaneous or cutaneous forms are observed in almost two-third of cases (24). Multiple cutaneous ulcers, mucocutaneous involvement as well as disseminated forms are frequent clinical manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients (17).

Leishmania replicate preferentially in macrophages of patients in which the Th1 type of cytokine response has been abrogated (6). The selective depletion of CD4⁺ T-lymphocyte subset during HIV infection accelerates the impairment of Th1 type of cytokine response leading to the dissemination of *Leishmania* which, in turn, accelerates HIV-1 infection (7-8). We have demonstrated previously that HIV/*Leishmania* co-infected patients with mucocutaneous leishmaniasis showed a decreased in the ratio of inflammatory and regulatory cytokines (RODRIGUES, *et al.*, unpublished data).

The immunological mechanisms involved in the pathogenesis of mucocutaneous lesions in HIV/*Leishmania* co-infected patients remain unclear, since HIV-infected patients have a decreased proportion of pathogens-specific memory T cells. The aim of this study was to evaluate the proportion *Leishmania*-specific central and effector memory T-cells in HIV/*Leishmania* co-infected patients.

Methods

Subjects.

Twenty-one subjects were included in the study: five patients with HIV/*Leishmania* co-infection, ten patients with *Leishmania* infection and six healthy controls. All *Leishmania* infected subjects had Tegumentary Leishmaniasis. Patients were selected in the Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES) and Hospital Geral Roberto Santos (HGRS), in Salvador, Bahia, Brazil. The CD4⁺ T-cell count of patients co-infected with HIV and *Leishmania* (241 cells/mm³, IQR 85-453) was significantly lower compared to CD4⁺ T-cell count of *Leishmania* infected patients (784 cells/mm³, IQR 599-1477) (p=0.004). The median HIV viral load of patients co-infected was 4.6 log copies/ml (IQR 1.9-5.2). There was no significant difference in the median age of patients between the groups of patients. Informed consent was obtained from all subjects. Institutional review board approval was obtained from Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) and Comitê de Ética em Pesquisa da

FIOCRUZ. In three HIV/*Leishmania* co-infected patients was evaluated the immune response after treatment for Leishmaniasis.

Antigens and antibodies.

Soluble *Leishmania* antigen (SLA) was prepared at the LPBI-(Laboratório de Patologia e Biointervenção) Fiocruz Bahia-Brazil. Briefly, *Leishmania amazonensis* stationary phase promastigotes were ultrasonicated and centrifuged at 20,000 xg for 2 h. Finally, the supernatant was frozen and subsequently used at a final concentration of 10 µg/ml. Phytohemagglutinin (PHA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as positive control at the final concentration of 2 µg/ml.

Monoclonal antibodies CD4 (PE and FITC), CD45RA (PE), CD62L (PE-Cy5) and CCR7 (PE-Cy7), CD28 (unconjugated) and isotypes controls IgG1 and IgG2 were obtained from Becton Dickinson Pharmingen (San Jose, California). Monoclonal antibodies CD8 (PE-Cy5) were obtained from eBioscience (San Diego, CA, USA).

Cells.

The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by passage over a Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) gradient. After washing three times, the PBMC were cryopreserved and stored in liquid nitrogen, until the time of analysis.

Proliferation of antigen-specific CD4⁺ T cells.

PBMC were labeled with CFSE (Invitrogen, Eugene, USA) by incubating 1.5×10^6 cells with a 1.5-µM solution of CFSE in phosphate buffered saline-bovine serum albumin (PBS-BSA) for 20 min at 37 °C followed by two washes. CFSE-labeled cells were cultured with SLA or PHA for 5 days in RPMI-1640 (Gibco, New York, USA) supplemented with L-glutamine, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) (Gibco) and 10 % AB serum at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ atmosphere. Then, cells were washed with PBS-BSA, and stained with monoclonal antibodies (anti-CD4-PE and anti-CD8 PE-Cy5) for 30 min. Cells were acquired by FACS Aria (Becton Dickinson,

CA, USA). The gate of CD4 and CD8 were done in viable lymphocytes. Analyses were performed using the Flowjo™ software (7.6, Tree Star, Inc. 1997 – 2009). The intensity of proliferation was determined using the cell division index (9). The threshold to define positive proliferative response was cell division index above 0.06 for CD4⁺ T-cell and above 0.09 CD8⁺ T-cell subset.

Flow cytometric detection of CD4⁺ T-cells maturation state.

The frequency memory specific CD4⁺ T-cell was assessed by four-color flow cytometry staining. Briefly, 1.5×10^6 PBMC were cultured with RPMI-1640 (Gibco, New York, USA) supplemented with L-glutamine, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) (Gibco) and 10 % fetal bovine serum in presence of 0.5 µg purified anti-CD28 antibody and SLA or PHA stimulus, and incubated at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ atmosphere for 18 hours. Control conditions included the absence of antigen with basal interleukin-2 (1µg/mL) and co-stimulatory monoclonal antibodies alone. Then, cells were washed with PBS and incubated with anti-CD4-FITC, anti-CD45RA-PE, anti-CD62L-PE-Cy5, and anti-CCR7-PE-Cy7 for 30 min. Stained cells were acquired by FACS Aria flow cytometer and analyzed by FlowJo software. For each analysis, viable lymphocytes were gated using forward and side scatter, memory cells were determined within CD4⁺ T-cells gate. Central memory T-cells (TCM) were identified by CD45RA⁻CD62L⁺CCR7⁺ and effector memory T-cell (TEM) were identified by CD45RA⁻CD62L⁻CCR7⁻. The absolute value of lymphocyte subsets was calculated based on total number of lymphocytes.

Statistical analysis.

Data were expressed as median and interquartile range (IQR). To determine significance of differences between subjects groups was assessed by the Mann-Whitney test and Fisher's exact test using the GraphPad Prism 5.02 (La Jolla, CA, USA). A p value of less than 0.05 denoted a statistically significant difference.

Result

A proliferative response against *Leishmania* antigens was observed in the CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subset of 1 out of 5 (20 %) of HIV/*Leishmania* co-infected individual (HIV/Leish 14). In contrast, both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subset from all patients infected with *Leishmania* solely proliferated in response to *Leishmania* antigens ($p < 0.05$). A proliferative response of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells after stimulation with PHA was observed in all co-infected patients and patients infected *Leishmania* solely (**Figure 1**). HIV and *Leishmania* co-infected patients have a median of cell division index from CD4⁺ T-cells (0.06, IQR 0.05-0.1) and CD8⁺ T-cells (0.05, IQR 0.01-0.08) significantly lower compared with the patients infected only by *Leishmania* (cell division index of CD4⁺ T-cells: 0.18, IQR 0.15-0.26 and cell division index of CD8⁺ T-cells: 0.2, IQR 0.15-0.26) ($p = 0.006$) (**Figure 2**).

The proportion of central memory CD4⁺ T-cells (TCM) and effector memory CD4⁺ T-cells (TEM) *Leishmania*-specific were similar in both HIV/*Leishmania* co-infected patients and patients infected solely with *Leishmania* (**Table 1**). However, the absolute count of TEM cells in the co-infected group (5 cells/mm³, IQR 3-28 cells/mm³) was significantly lower compared with the count of TEM in the group *Leishmania* (121 cells/mm³, IQR 61-139 cells/mm³) ($p = 0.002$). The same was observed for the TCM cells, in co-infected patients the median count was 3 cells/mm³ (1-13 cells/mm³), while in the *Leishmania* infected patients the median count was 46 cells/mm³ (IQR 20-128 cells/mm³) (**Table 1**).

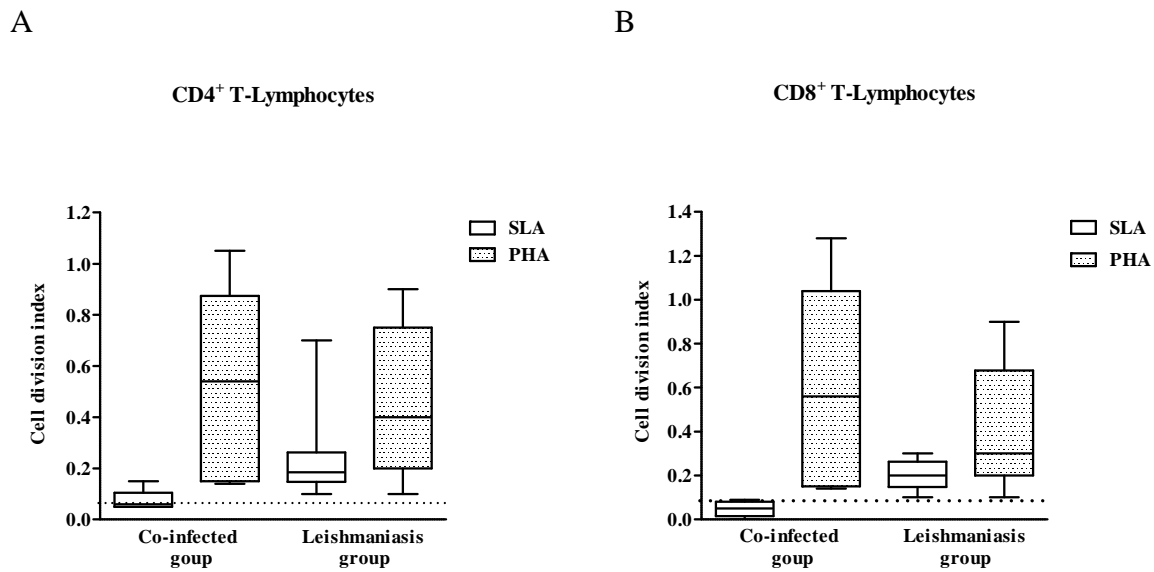


Figure 1. Cell division index of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells after stimulation with *Leishmania* antigens (SLA) and phytohemagglutinin (PHA) of HIV/*Leishmania* co-infected patients and *Leishmania* only infected patients. The dates were showed in median. **A)** Cell division index of CD4⁺ T-cells. The dashed line represents the threshold to define positive proliferative response (cell division index > 0.06). **B)** Cell division index of CD8⁺ T-cells. The dashed line represents the threshold to define positive proliferative response (cell division index > 0.09).

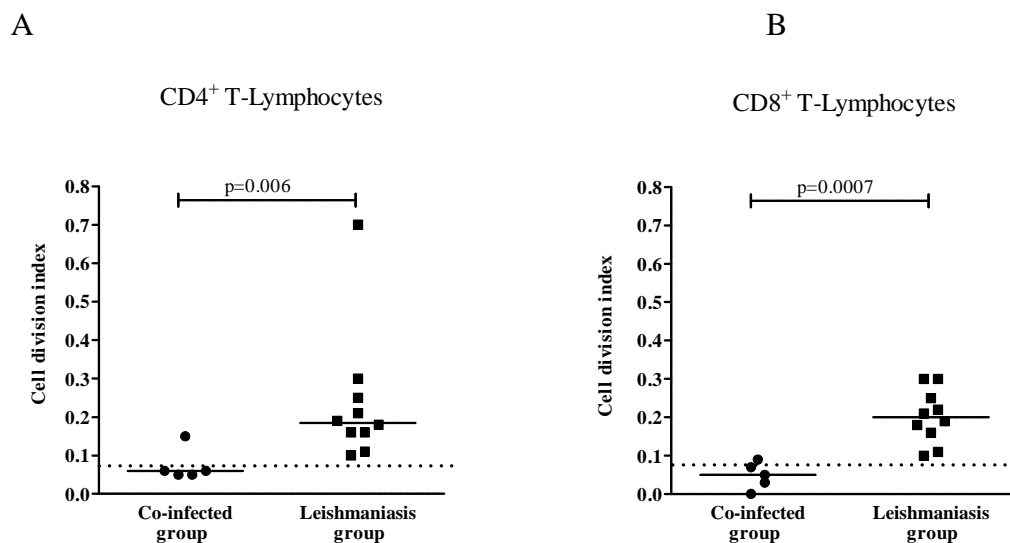


Figure 2. Proliferative response to *Leishmania* antigens of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from HIV/*Leishmania* co-infected patients (●) and *Leishmania* only infected patients (■). Medians are indicated by horizontal bars. Mann Whitney test was used to compare groups. Significant differences were found between groups ($p < 0.05$). **A)** Cell division index of CD4⁺ T-cells. The dashed line represents the threshold to define positive proliferative response (cell division index > 0.06). **B)** Cell division index of CD8⁺ T-cells. The dashed line represents the threshold to define positive proliferative response (cell division index > 0.09).

Table 1. . Percentage and count of *Leishmania*-specific CD4⁺ T-cell subset

CD4 ⁺ T-cell subset	Co-infected	Leishmaniasis solely	p
<i>Effector memory</i>			
%	15 (11-54)	17 (13-22)	0.9
Cell/mm ³	5 (3-28)	121 (61-139)	0.002
<i>Central memory</i>			
%	12 (2-25)	11 (2-22)	0.9
Cell/mm ³	3 (1-13)	46 (20-128)	0.004

Data are presented as median (IQR). Mann-Whitney test (p), statistical differences between HIV/*Leishmania* co-infected and leishmaniasis groups.

Discussion

HIV/*Leishmania* co-infected patients have a more severe *Leishmania* disease with treatment relapses and dissemination of parasites. There are evidences that Th1 protective response against *Leishmania* is abrogated in HIV-infected individuals, with lower IFN- γ production (20-21). This study demonstrated that in HIV/*Leishmania* co-infected patients there is a decrease in the lymphoproliferative response against *Leishmania* antigens, probably due to a decrease in the count of *Leishmania*-specific memory cells. There was a similar proportion of TEM and TCM between co-infected patients and *Leishmania* solely infected patients. However, the absolute count of TEM and TCM in co-infected patients was decreased. It could explain why co-infected patients had a significant decrease in the IFN- γ production and in the ratio of inflammatory cytokine, IFN- γ , to the regulatory cytokine, IL-10. This decrease might be associated with replication of *Leishmania* (14-15).

It is possible that the selective depletion of CD4⁺ of T-lymphocytes during HIV infection accelerates the impairment of Th1 response leading to the dissemination of *Leishmania* in the reticuloendothelial system of the co-infected patient and that this, in turn, accelerates HIV-1 infection. The absence of lymphoproliferation in HIV/*Leishmania* co-infected patients demonstrates the inability of the cellular immune response to control the

spread of *Leishmania*. This alteration could contribute with the elevated parasitemia and with atypical and disseminated lesions described in HIV/*Leishmania* co-infected patients.

The HIV-infection leads decreased antigens-specific memory responses (11-12). In the other hand, the CD4⁺ and CD8⁺ T-cells were able to proliferate in response to PHA, suggesting that the deficiency in lymphoproliferation appears to be *Leishmania*-specific.

Atypical lesions of Tegumentary Leishmaniasis are described in HIV-infected patients, mostly in severely immunosuppressed cases (16-17). Despite the reduction in Th1 response in HIV-infection, the immunopathogenic mechanisms involved in lesions of Tegumentary Leishmaniasis in HIV/*Leishmania* co-infected patients are unclear. We suggest that the atypical and disseminated lesions were due to the decrease of protective CD4⁺ T-cells *Leishmania*-specific. Then, mucosal involvement described in co-infected patients might be secondary to an exacerbated production of TNF- α observed during HIV infection (24) or the presence to Th17 T-cells subset. Further studies should be conducted to evaluate the role of innate immune response in co-infection with HIV and *Leishmania*.

Acknowledgment

Soluble *Leishmania* antigen (SLA) was kindly provided by Dr Geraldo Gileno at the LPBI-(Laboratório de Patologia e Biointervenção) Fiocruz Bahia-Brazil.

References

1. Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003;97 Suppl 1:3-15.
2. Badaró R. When *Leishmania* and HIV Interact, a New Broad Spectrum of Leishmaniasis Occurs. *Braz J Infect Dis*. 1997;1(3):145-8.
3. Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 1996;22(1):1-13.
4. Fauci AS. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science*. 1988;239(4840):617-22.
5. Turco SJ. Adversarial relationship between the leishmania lipophosphoglycan and protein kinase C of host macrophages. *Parasite Immunol*. 1999;21(12):597-600.

6. Wolday D, Berhe N, Akuffo H, Britton S. *Leishmania*-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. *Parasitol Today*. 1999;15(5):182-7.
7. Bernier R, Turco SJ, Olivier M, Tremblay M. Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoïd cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J Virol*. 1995;69(11):7282-5. PMID: 189654.
8. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med*. 1998;187(6):875-83. PMID: 2212187.
9. Angulo R, Fulcher DA. Measurement of *Candida*-specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. *Cytometry*. 1998;34(3):143-51.
10. Da-Cruz AM, Machado ES, Menezes JA, Rutowitsch MS, Coutinho SG. Cellular and humoral immune responses of a patient with American cutaneous leishmaniasis and AIDS. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992;86(5):511-2.
11. Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Lucey DR, Via CS, *et al*. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest*. 1989;84(6):1892-9. PMID: 304069.
12. Gruters RA, Terpstra FG, De Jong R, Van Noesel CJ, Van Lier RA, Miedema F. Selective loss of T cell functions in different stages of HIV infection. Early loss of anti-CD3-induced T cell proliferation followed by decreased anti-CD3-induced cytotoxic T lymphocyte generation in AIDS-related complex and AIDS. *Eur J Immunol*. 1990;20(5):1039-44.
13. Carvalho EM, Teixeira RS, Johnson WD, Jr. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect Immun*. 1981;33(2):498-500. PMID: 350726.
14. Wolday D, Akuffo H, Britton S, Hathaway A, Sander B. HIV-1 inhibits *Leishmania*-induced cell proliferation but not production of interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha. *Scand J Immunol*. 1994;39(4):380-6.
15. Olivier M, Badaro R, Medrano FJ, Moreno J. The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003;97 Suppl 1:79-98.
16. Mattos M, Caiza A, Fernandes O, Goncalves AJ, Pirmez C, Souza CS, *et al*. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV infection: report of four cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1998;10(3):218-25.
17. Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, *et al*. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol*. 2009;160(2):311-8.

18. Casado JL, Lopez-Velez R, Pintado V, Quereda C, Antela A, Moreno S. Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001;20(3):202-5.
19. Berhe N, Wolday D, Hailu A, Abraham Y, Ali A, Gebre-Michael T, *et al*. HIV viral load and response to antileishmanial chemotherapy in co-infected patients. *AIDS*. 1999;13(14):1921-5.
20. Medrano FJ, Rey C, Leal M, Cañavate C, Rubio A, Sanchez-Quijano A, *et al*. Dynamics of serum cytokines in patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection. *Clin Exp Immunol*. 1998; 114:403-7.
21. Nigro L, Cacopardo B, Preiser W, Braner J, Cinatl J, Palermo F, *et al*. In vitro production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from subjects co-infected with Human Immunodeficiency virus and *Leishmania infantum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1999; 60(1):142-5.
22. Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, *et al*. *Leishmania* and Human Immunodeficiency Virus co-infection: the first 10 years. 1997; *Clin Microbiol Rev* 10(2): 298-319.
23. Rabello A, Orsin M, Disch. *Leishmania/HIV* co-infection in Brazil:an appraisal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2003. 97(1): S17-S28.
24. Aukrust P, Liabakk NB, Muller F, Lien E, Espevik T, Froland SS. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) and soluble TNF receptors in human immunodeficiency virus type 1 infection--correlations to clinical, immunologic, and virologic parameters. *J Infect Dis* 1994;169(2):420-424.

5 CAPÍTULO II

Durante a busca de pacientes, foi identificado um caso de coinfeção por HIV/*Leishmania* associado à síndrome inflamatória de reconstituição imune (IRIS), com manifestação clínica de leishmaniose mucocutânea. Existem poucos relatos de casos, como este, descritos na literatura, além disso, a resposta imune envolvida na IRIS, sobretudo associado à leishmaniose, é pouco compreendida. O relato deste caso e a avaliação da resposta imune envolvida nas manifestações da leishmaniose mucocutânea relacionada a IRIS intitulado: *Immune response to Leishmania antigens in an HIV-infected patient with mucocutaneous leishmaniasis as a manifestation of IRIS: a case report* foi submetido para a revista *Clinical and Vaccine Immunology* (CVI).

5.1 IMMUNE RESPONSE TO *LEISHMANIA* ANTIGENS IN AN HIV-INFECTED PATIENT WITH MUCOCUTANEOUS LEISHMANIASIS AS A MANIFESTATION OF IRIS: A CASE REPORT

Luana Gois¹, Roberto Badaró², Robert Schooley³, Maria Fernanda Rios Grassi*^{1,4}

**1- Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ),
Brazil**

2 – Hospital Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Brazil

3- Department of Medicine, University of California, San Diego, USA

4- Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Brazil

Corresponding author:

Maria Fernanda Rios Grassi

e-mail: grassi@bahia.fiocruz.br

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA- Brazil CEP: 40296-710

Phone: +55 (71) 3176-2213 – FAX: +55 (71) 3176-2327

Abstract

We evaluate the immune response of a patient with mucocutaneous leishmaniasis associated with IRIS, before and after healing. The manifestation of IRIS was associated with high levels of TNF- α and IL-6 and a decreased IFN- γ production as well as a low IFN- γ /IL-10 ratio. After leishmaniasis healed, the specific Th1 immune response was restored.

Introduction

Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) is characterized by an inflammatory immune response against noninfectious or infectious antigens in immunosuppressed patients whose immune systems have recovered following highly active antiretroviral treatment (HAART). These antigens, or sub-clinical infections, are often present prior to the onset of HAART [15]. Patients with IRIS experience a paradoxical deterioration of clinical conditions concomitant with the restoration of their immune systems [9]. Most cases of IRIS are associated with infections caused by the *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis*, cytomegalovirus or herpes zoster [8, 19].

Leishmania spp. are considered to be opportunistic pathogens in HIV-infected patients [3, 7]. Currently, there are few reports of tegumentary leishmaniasis as a manifestation of IRIS in patients with AIDS [6, 17, 20]. The immunological mechanisms involved in the development of IRIS-associated infections remain unclear, specifically the role of antigen-specific T-cells in response to these opportunistic infections. The aim of this report was to describe the cellular immune response to *Leishmania* antigens, before and after the healing of lesions, in a patient with mucocutaneous leishmaniasis as a manifestation of IRIS.

Case report

A 29-year-old HIV-1-infected male was hospitalized due to mucocutaneous leishmaniasis as a manifestation of IRIS six months following the onset of HAART (AZT+3TC+ EFZ). His CD4⁺ T-cell count had risen to 516 cells/mm³ from 160 cells/mm³ six months prior to hospitalization, and his HIV viral load, which was 92,479 copies/ml, was now undetectable. A skin biopsy revealed the presence of numerous intracellular amastigote forms of *Leishmania spp.* The skin test for *Leishmania* was positive (15mm), ELISA for *L. brasiliensis* antigens was positive, but ELISA for rK39 was negative. The patient also reported that he had been treated for pulmonary tuberculosis six months before being diagnosed with AIDS. The patient was treated with a corticosteroid in high doses and intravenous amphotericin B. Fifteen days later, a marked improvement in the patient's mucocutaneous lesions was observed.

Materials and Methods

Cell proliferation assay.

To investigate the specific T-cell response against *Leishmania* antigens, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained before and after treatment with amphotericin B. PBMCs were cultured in the presence of either 10µg/ml of soluble *Leishmania* antigen (SLA) [5], 5µg/ml of phytohaemagglutinin (PHA), or culture medium, with 1.5 µM carboxyfluorescein succinimidyl ester dye (CFSE, Molecular Probes, Eugene, OR), for a period of five days [12]. Next, PBMCs were stained with CD4 and CD8 monoclonal antibodies conjugated with phycoerythrin (PE) and allophycocyanin (APC). Cell acquisition was performed using a FACS Aria Flow Cytometer (Becton Dickinson, CA, USA) and subsequently analyzed by Flowjo™ software (7.6, Tree Star, Inc. 1997 – 2009). The cell division index was used to quantify the proliferation intensity of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. The cell division index thresholds for a positive proliferative response were determined to be 0.06 for CD4⁺ T-cells and 0.09 for CD8⁺ T-cell subsets.

Intracellular cytokine detection.

The proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells producing inflammatory (IFN- γ , TNF- α) and regulatory (IL-10) cytokines was quantified using flow cytometry following intracellular staining with monoclonal antibodies. PBMCs were cultured in the presence of SLA, PHA or RPMI-1640 medium for 18h. Heat-inactivated human AB serum, brefeldin A and monensin were added to all cultures in the final four hours. Then, the PBMCs were stained with anti-CD4-fluorescein isothiocyanate (FITC) and anti-CD8-APC, and permeabilized with PBS-BSA-Saponin 0.1%. In order to perform intracellular staining, the PBMCs were incubated with anti-IFN- γ -PE, anti-TNF- α -PE, and anti-IL-10-PE (Becton Dickinson, CA, USA).

Plasma cytokine measurement.

Cytokine levels were quantified in the patient's plasma using the human Th1/Th2 cytokine kit II, BD®, cytometric bead array (CBA) (San Jose, CA, USA).

A signed form of consent was obtained from the patient. The Fundação Oswaldo (FIOCRUZ) ethics committee approved this study.

Results

Prior to treatment with amphotericin B

At this time, the proliferative response to SLA was undetectable in both CD4⁺ (cell division index: 0.04) and CD8⁺ T-cell subsets (cell division index: 0.0) (**Figure 1** – white bars). In the absence of SLA stimulus, the production of IFN- γ by both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells was higher in comparison to SLA stimulation. Levels of TNF- α remained similar under both conditions, while IL-10 production was undetectable following SLA stimulation in the CD4⁺ T-cell subset (**Figure 2A**).

After treatment with Amphotericin B

Following leishmanial treatment, a proliferative response to SLA was observed in both CD4⁺ (cell division index: 0.3) and CD8⁺ T-cell subsets (cell division index: 0.2) (**Figure 1** – black bars). In the absence of SLA stimulus, production of IFN- γ , TNF- α and IL-10 by CD4⁺ T-cells was undetectable, and very few CD8⁺ T-cells were observed to be producing these cytokines. By contrast, in response to SLA stimulation, a high proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells producing TNF- α and IL-10 was detected (**Figure 2B**). Production of IFN- γ was markedly higher in CD8⁺ T-cells in comparison with that of CD4⁺ T-cells.

Plasmatic cytokine levels (INF- γ , TNF- α , IL-2 and IL-10) increased at the conclusion of treatment with amphotericin B, while IL-6 decreased, and the IFN- γ /IL-10 ratio rose from 0.0 to 3.6 (**Table 1**).

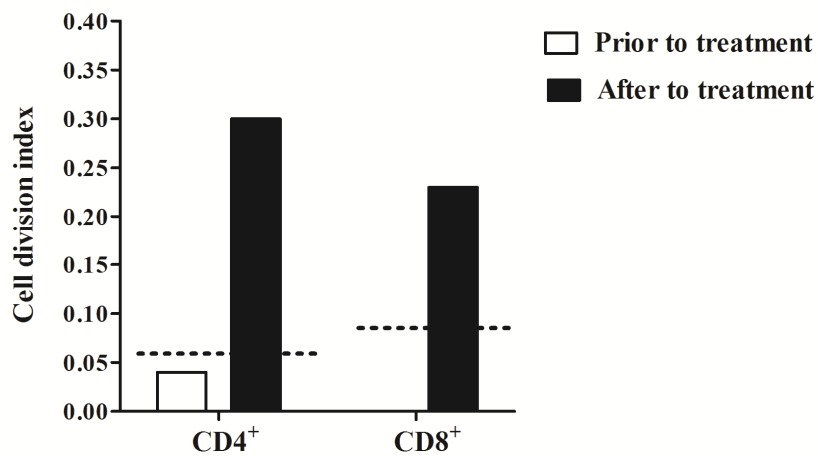


Figure 1. Evaluation of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes proliferation in response to SLA of a patient with mucocutaneous leishmaniasis as manifestation of IRIS, before and after amphotericin B treatment. For determined intensity proliferation were calculated the cell division index using the Flowjo™ software. White bars represent proliferative response prior to Amphotericin B treatment and black bars proliferative response after Amphotericin B treatment. The dashed line represents the threshold to define positive proliferative response (above 0.06 for CD4⁺ T-cell and above 0.09 CD8⁺ T-cell subset).

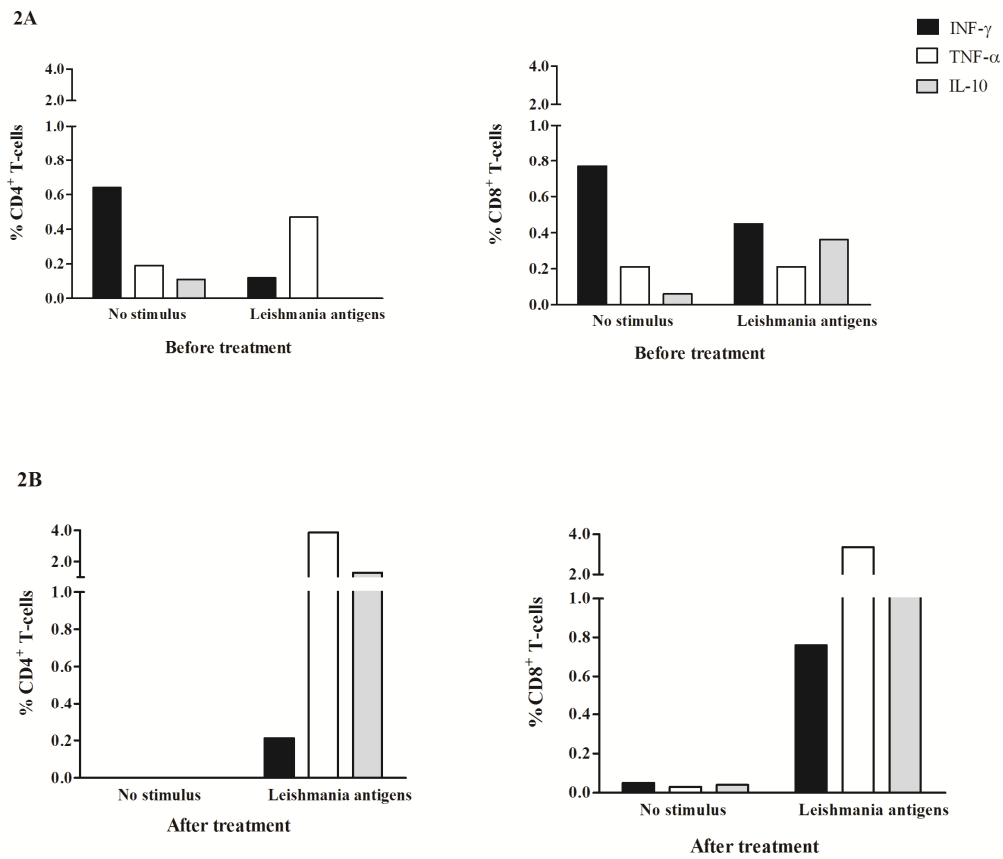


Figure 2. Proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells producing intracellular IFN- γ , TNF- α and IL-10 after culture without stimulus and with presence of SLA of a patient with mucocutaneous leishmaniasis as manifestation of IRIS, before (2A) and after amphotericin B treatment (2B).

Table 1. Cytokine level in the plasma of a patient with mucocutaneous leishmaniasis as manifestation of IRIS, before and after Amphotericin B treatment.

Cytokine	Amphotericin B treatment	
	Before	After
IFN- γ	0.0	47.7
TNF- α	11.1	17.8
IL-10	5.3	13.3
IL-2	15.0	22.5
IL-4	7.1	8.2
IL-6	17.6	10.6
IFN- γ /IL-10	0.0	3.6

Data are presented in pg/ml.

Discussion

The immunological mechanisms involved in the intense inflammatory response associated with IRIS, resulting in mucosal damage in AIDS patients with cutaneous leishmaniasis, remain unclear. The recovery of antigen-specific CD4⁺ T-cells has been implicated in the pathogenesis of intense inflammatory responses associated with IRIS in patients with *Mycobacterium tuberculosis* and *Cryptococcal meningitis* infections [1, 4, 13, 18, 22]. However, no studies have described the reconstitution of *Leishmania*-specific CD4⁺ T-cells in patients with leishmaniasis in association with IRIS. The present report found that mucosal damage resulting from mucocutaneous leishmaniasis as a manifestation of IRIS in this patient was correlated with an unspecific inflammatory milieu. In addition, a decrease in *Leishmania*-specific IFN- γ -production and a low IFN- γ /IL-10 ratio was observed during the course of IRIS. In this patient,

CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes produced very low levels of IFN- γ and TNF- α in response to *Leishmania* antigens. Conversely, after the lesions healed, a specific Th1 immune response to *Leishmania* antigens was reestablished, as evidenced by an increase in the production of Th1 cytokines, as well as in the IFN- γ /IL-10 ratio. Moreover, the lymphoproliferative response to specific *Leishmania* antigens was restored.

The elevated production of cytokines, even in non-stimulated cells, observed in the course of IRIS may be a consequence of activated memory CD4⁺ T-cells specific for pathogens other than *Leishmania* that recirculate from lymphoid organs into the peripheral blood stream, as described during the first two months of HAART [2, 10]. Moreover, the chronic activation of the immune system by HIV itself may also contribute to the inflammatory state observed during the course of IRIS [16]. High levels of IL-6 and TNF- α have been described in patients with infectious diseases in association with IRIS [1, 14, 21]. Furthermore, the nonspecific activation of the immune system could be a consequence of an impairment of the regulatory T-cell response, since IL-10 produced by *Leishmania*-specific CD4⁺ T-lymphocytes was not detected during the course of IRIS. Recently, another case report described a patient with cutaneous leishmaniasis as a manifestation of IRIS and found low proportion of regulatory T-cells (CD4⁺ Foxp3⁺ CD25^{high}) [6]. The proportion of regulatory T-cells (CD4⁺ Foxp3⁺) in our patient during the course of IRIS was also found to be low, 1.8% (data not shown), which is consistent with the previous report. Lim and cols [11] have suggested that an imbalance between effector and regulatory responses could play a role in the pathogenesis of IRIS. The impairment of regulatory T-cells, which are unable to suppress the proliferation of T-lymphocytes and the production of IFN- γ , TNF- α and IL-6, has been reported in patients with mycobacterial diseases in association with IRIS[13].

In summary, the disproportionate antigen-specific immune response that is restored following the onset of HAART seems to provoke manifestations characteristic of IRIS. In this report, the exacerbation of a nonspecific inflammatory response and a decrease in the regulatory response were concurrently involved in the development of mucosal lesions. Studies involving a larger number of patients that conduct assessments of immune responses in the mucosa should be carried out to elucidate the pathogenesis of leishmaniasis in association with IRIS.

Acknowledgments

Soluble *Leishmania* antigen (SLA) was kindly provided by Dr. Geraldo Gileno at the LPBI-(Laboratório de Patologia e Biointervenção) Fiocruz Bahia-Brazil. We would like thank Andris K. Walter for his assistance in English revision.

References

1. Antonelli, L.R., et al., Elevated frequencies of highly activated CD4+ T cells in HIV+ patients developing immune reconstitution inflammatory syndrome. *Blood*, 2010. **116**(19): p. 3818-27.
2. Autran, B., et al., Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science*, 1997. **277**(5322): p. 112-6.
3. Badaro, R., When *Leishmania* and HIV Interact, a New Broad Spectrum of Leishmaniasis Occurs. *Braz J Infect Dis*, 1997. **1**(3): p. 145-148.
4. Bourgarit, A., et al., Explosion of tuberculin-specific Th1-responses induces immune restoration syndrome in tuberculosis and HIV co-infected patients. *AIDS*, 2006. **20**(2): p. F1-7.
5. Carvalho, E.M., et al., Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol*, 1985. **135**(6): p. 4144-8.
6. Chrusciak-Talhari, A., et al., Tegumentary leishmaniasis as the cause of immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient co-infected with human immunodeficiency virus and *Leishmania guyanensis*. *Am J Trop Med Hyg*, 2009. **81**(4): p. 559-64.
7. Cruz, I., et al., *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*, 2006. **123**(3): p. 357-88.
8. French, M.A., HIV/AIDS: immune reconstitution inflammatory syndrome: a reappraisal. *Clin Infect Dis*, 2009. **48**(1): p. 101-7.
9. French, M.A., et al., Immune restoration disease after the treatment of immunodeficient HIV-infected patients with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med*, 2000. **1**(2): p. 107-15.
10. Kelleher, A.D., et al., Alterations in the immune response of human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects treated with an HIV-specific protease inhibitor, ritonavir. *J Infect Dis*, 1996. **173**(2): p. 321-9.
11. Lim, A., et al., Imbalanced effector and regulatory cytokine responses may underlie mycobacterial immune restoration disease. *AIDS Res Ther*, 2008. **5**: p. 9.

12. Lyons, A.B. and K.V. Doherty, Flow cytometric analysis of cell division by dye dilution. *Curr Protoc Cytom*, 2004. **Chapter 9**: p. Unit 9 11.
13. Meintjes, G., et al., Type 1 helper T cells and FoxP3-positive T cells in HIV-tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. **178**(10): p. 1083-9.
14. Morlese, J.F., et al., Plasma IL-6 as a marker of mycobacterial immune restoration disease in HIV-1 infection. *AIDS*, 2003. **17**(9): p. 1411-3.
15. Murdoch, D.M., et al., Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS): review of common infectious manifestations and treatment options. *AIDS Res Ther*, 2007. **4**: p. 9.
16. Pantaleo, G., C. Graziosi, and A.S. Fauci, New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*, 1993. **328**(5): p. 327-35.
17. Posada-Vergara, M.P., et al., Tegumentary leishmaniasis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome in 2 patients with AIDS. *J Infect Dis*, 2005. **192**(10): p. 1819-22.
18. Seddiki, N., et al., Proliferation of weakly suppressive regulatory CD4+ T cells is associated with over-active CD4+ T-cell responses in HIV-positive patients with mycobacterial immune restoration disease. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(2): p. 391-403.
19. Shelburne, S.A., 3rd, et al., Immune reconstitution inflammatory syndrome: emergence of a unique syndrome during highly active antiretroviral therapy. *Medicine (Baltimore)*, 2002. **81**(3): p. 213-27.
20. Sinha, S., et al., Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *Int J Dermatol*, 2008. **47**(12): p. 1263-70.
21. Stone, S.F., et al., Levels of IL-6 and soluble IL-6 receptor are increased in HIV patients with a history of immune restoration disease after HAART. *HIV Med*, 2002. **3**(1): p. 21-7.
22. Tan, L.C., et al., Marked variation in clinical presentation and age of onset in a family with a heterozygous parkin mutation. *Mov Disord*, 2003. **18**(7): p. 758-63.

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações da resposta imune celular aos antígenos de *Leishmania* encontradas nos pacientes coinfectados por HIV e *Leishmania*. Neste contexto, foi avaliada a concentração de citocinas Th1 e Th2 no plasma (RODRIGUES, *et al.*, 2011, em apêndice), a resposta linfoproliferativa aos antígenos de *Leishmania* e a proporção de linfócitos T CD4⁺ específicos de memória. Além disso, foi avaliada a restauração da resposta imune específica aos antígenos de *Leishmania* nos pacientes coinfectados após o tratamento para a leishmaniose.

Nossos resultados anteriores demonstraram que as PBMC dos pacientes coinfectados por HIV e *Leishmania* produzem menos IFN- γ em resposta aos antígenos de *Leishmania* (SLA) em comparação do que com os pacientes infectados apenas por *Leishmania*. Do mesmo modo, diferença significativa entre a razão IFN- γ /IL-10 foi encontrada no plasma e no sobrenadante das PBMC estimuladas com SLA nos pacientes coinfectados em comparação com os pacientes infectados apenas por *Leishmania*. No plasma dos pacientes coinfectados por HIV e *Leishmania* foi também encontrada uma diminuição na concentração de IFN- γ em comparação com os pacientes infectados apenas por *Leishmania* (RODRIGUES, *et al.*, 2011, em apêndice). O IFN- γ é uma citocina inflamatória importante na resposta imune contra a *Leishmania*, por ativar macrófagos a desencadear a morte intracelular deste parasita (MURRAY, RUBIN, *et al.*, 1983). A diminuição da concentração desta citocina pode contribuir para a disseminação do parasita no hospedeiro, como é relado nos pacientes coinfectados (ALVAR, CANAVATE, *et al.*, 1997; WOLDAY, AKUFFO, *et al.*, 1994).

O equilíbrio entre as citocinas inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e regulatórias (IL-10) possibilita o controle da resposta imune, promovendo a morte do parasite e a não destruição tecidual nos pacientes com leishmaniose (BACELLAR, LESSA, *et al.*, 2002; BELKAID, PICCIRILLO, *et al.*, 2002). Nos pacientes com a forma mucocutânea da leishmaniose são descritos altas concentrações de IFN- γ e TNF- α e baixa concentração de IL-10, o que estão associados à destruição decidual exacerbada (GOMES-SILVA, DE CASSIA BITTAR, *et al.*, 2007). Possivelmente, a alteração da razão entre as citocinas inflamatórias e regulatórias permite a contínua replicação da *Leishmania* e contribua para a formação das lesões atípicas descritas nos pacientes coinfectados (CRUZ, NIETO, *et al.*, 2006).

As PBMC dos indivíduos com leishmaniose mucocutânea produzem elevadas concentrações de TNF- α (BACELLAR, LESSA, *et al.*, 2002). Por outro lado, indivíduos infectados por HIV possuem elevadas concentrações circulantes de TNF- α (AUKRUST, LIABAKK, *et al.*, 1994). É provável que o TNF- α tenha um papel importante no severo dano tecidual observado nos pacientes coinfectados.

Apesar da redução na resposta Th1 presente em pacientes com HIV, é provável que a diminuição da razão IFN- γ /IL-10 e a presença de TNF- α encontrada nos indivíduos coinfectados contribuam para as manifestações atípicas e o elevado dano mucoso descritos nos casos de leishmaniose cutânea e mucosa nestes indivíduos infectados (LINDOSO, BARBOSA, *et al.*, 2009; MATTOS, CAIZA, *et al.*, 1998).

Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ dos pacientes coinfectados por HIV e *Leishmania* tem menor potencial de proliferação em resposta aos antígenos de *Leishmania* demonstrando a incapacidade da resposta imune celular de controlar a disseminação da infecção por *Leishmania*. A ausência da resposta linfoproliferativa aos antígenos de *Leishmania* (SLA) e à concavalina A também foi relada em um de dois pacientes coinfectados por HIV/*Leishmania* com leishmaniose cutânea (DA-CRUZ, MACHADO, *et al.*, 1992). A imunossupressão causada pela infecção do HIV pode estar associada à redução da resposta linfoproliferativa aos antígenos de *Leishmania*. Tal redução pode favorecer a elevada parasitemia e a não eliminação do parasita (OLIVIER, BADARO, *et al.*, 2003; WOLDAY, AKUFFO, *et al.*, 1994). No entanto, as células foram capazes de proliferar em resposta à PHA, por tanto, provavelmente a deficiência encontrada na resposta linfoproliferativa parece ser específica ao antígeno de *Leishmania*.

O único paciente coinfectado (1 de 5) que os linfócitos apresentavam capacidade proliferativa em resposta ao antígeno de *Leishmania*, não diferia do restante do grupo, em relação à carga viral nem em relação à contagem dos linfócitos T CD4⁺. Este paciente (HIV/Leish 14), no momento da coleta possuía lesões ulceradas no membro inferior, cotovelos e mucosa nasal, sem sucesso terapêutico.

Previamente, foi demonstrado que a infecção pelo HIV provoca a diminuição da resposta específica a antígenos de memória (CLERICI, STOCKS, *et al.*, 1989; GRUTERS, TERPSTRA, *et al.*, 1990). Nos pacientes coinfectados por HIV e *Leishmania*, a contagem absoluta dos linfócitos T CD4⁺ de memória central (TCM) e efetora (TEM) específicos para *Leishmania* estava diminuída em comparação com os pacientes infectados apenas com *Leishmania*.

Neste estudo, foi demonstrado que a diminuição da resposta linfoproliferativa aos antígenos de *Leishmania* nos pacientes coinfectados por HIV e *Leishmania* foi provavelmente devido à diminuição do número de linfócitos T CD4⁺ de memória específicos. Apesar da proporção de TCM e TEM específicas à *Leishmania* terem sido similares entre os pacientes coinfectados e os pacientes infectados apenas por *Leishmania*, a contagem absoluta destas subpopulações de células de memória específicas foi menor nos pacientes coinfectados. Isto poderia explicar porque os pacientes coinfectados possuem uma significativa diminuição da produção de IFN- γ e da razão IFN- γ /IL-10 (RODRIGUES, *et al.*, 2011, em apêndice). Tal redução demonstra o prejuízo da resposta imune celular, como visto na ausência da resposta de hipersensibilidade tardia (DTH) para antígenos de *Leishmania* nos pacientes coinfectados (BADARO, 1997).

Nossos dados preliminares, avaliando a resposta imune específica aos antígenos de *Leishmania* nos pacientes coinfectados após o tratamento específico para leishmaniose, demonstram que recuperam a resposta imune específica após o tratamento. Quatro pacientes coinfectados por HIV e *Leishmania* avaliados apresentaram aumento da concentração de IFN- γ (30 pg/mL) e de TNF- α (16,8 pg/mL) no plasma em comparação aos do início do tratamento (IFN- γ : 3 pg/mL; TNF- α 10 pg/mL) (dados não apresentados). Esta diferença não foi significativa, provavelmente devido ao reduzido número de pacientes analisados. Foi observada, igualmente, a recuperação da resposta proliferativa dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ aos antígenos de *Leishmania* (SLA) (dados não apresentados). Todos os pacientes coinfectados (três pacientes) avaliados após o tratamento demonstraram resposta proliferativa ao SLA (Índice de divisão celular dos linfócitos T CD4⁺: 0,2; índice de divisão celular dos linfócitos T CD8⁺: 0,3). Apesar da recuperação da resposta celular específica, o número de recidivas de leishmaniose em pacientes infectados por HIV é elevado (CRUZ, NIETO, *et al.*, 2006). É possível que as células específicas para *Leishmania* sejam perdidas devido à morte preferencial das células T de memória ativadas nos pacientes infectados pelo HIV (JANOSSY, BORTHWICK, *et al.*, 1993). É importante avaliar um maior número de pacientes coinfectados após o tratamento para determinar se os indivíduos infectados por HIV são capazes de recuperar completamente a resposta imune específica à *Leishmania* e identificar possíveis marcadores de reativação da leishmaniose.

A ocorrência de múltiplas lesões com envolvimento mucocutâneo descritas nos pacientes coinfectados por HIV e *Leishmania* (LINDOSO, BARBOSA, *et al.*, 2009) parece não ser devido a exacerbação da resposta Th1 específica para a *Leishmania*. A resposta imune inata, com produção de TNF- α por macrófagos ou por linfócitos T ativados por antígenos virais poderiam estar envolvidos na patogênese da leishmaniose tegumentar em pacientes com ADIS (AUKRUST, *et al.*, 1994). Por outro lado, tem sido demonstrado que a resposta Th17 promove a progressão de leishmaniose cutânea (BACELLAR, *et al.*, 2009; BOAVENTURA *et al.*, 2010).

Assim, a resposta Th1 específica para a *Leishmania* é ausente nos pacientes coinfectados por HIV/*Leishmania*. A imunopatogênese do envolvimento mucoso nestes pacientes não está esclarecida. É necessário avaliar a composição celular nas lesões e o papel dos linfócitos T CD8⁺, dos linfócitos Th17 e da resposta imune inata.

7 CONCLUSÃO

1 Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ dos pacientes coinfectedados por HIV e *Leishmania* tem menor capacidade de proliferação em resposta aos antígenos de *Leishmania*, demonstrando um prejuízo funcional na imunidade celular específica;

3 A contagem absoluta dos linfócitos T CD4⁺ de memória central e efetora específicos para *Leishmania* nos pacientes coinfectedados por HIV e *Leishmania* é menor em comparação com os pacientes infectados apenas com *Leishmania*;

REFERÊNCIAS

ALVAR, J., *et al.* *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 298-319, Apr 1997.

ANGULO, R.; FULCHER, D. A. Measurement of *Candida*-specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. *Cytometry* [S.I.], v. 34, n. 3, p. 143-51, Jun 15 1998.

APPAY, V., *et al.* Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* [S.I.], v. 8, n. 4, p. 379-85, Apr 2002.

ASHFORD, R. W., *et al.* Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitol Today* [S.I.], v. 8, n. 3, p. 104-5, Mar 1992.

ATTA, A. M., *et al.* Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 59, n. 3, p. 426-30, Sep 1998.

AUTRAN, B., *et al.* Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* [S.I.], v. 277, n. 5322, p. 112-6, Jul 4 1997.

AUKRUST P, *et al.* Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) and soluble TNF receptors in human immunodeficiency virus type 1 infection--correlations to clinical, immunologic, and virologic parameters. *J Infect Dis* v. 169, n. 2, p. 420-24, 1994.

BACELLAR, O., *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* [S.I.], v. 70, n. 12, p. 6734-40, Dec 2002.

BACELLAR, O., *et al.* Th17 production in patients with american cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*, v. 200, n. 1, p. 75-8, Jul 2009.

BADARO, R. When *Leishmania* and HIV Interact, a New Broad Spectrum of Leishmaniasis Occurs. *Braz J Infect Dis* [S.I.], v. 1, n. 3, p. 145-148, Jun 1997.

BARRE-SINOUSSE, F. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* [S.I.], v. 348, n. 9019, p. 31-5, Jul 6 1996.

BARRE-SINOUSSE, F., *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* [S.I.], v. 220, n. 4599, p. 868-71, May 20 1983.

BENITO, J. M., *et al.* 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* [S.I.], v. 14, n. 2, p. 128-35, Feb 1 1997.

BERHE, N., *et al.* HIV viral load and response to antileishmanial chemotherapy in co-infected patients. *AIDS* [S.I.], v. 13, n. 14, p. 1921-5, Oct 1 1999.

BERNIER, R., *et al.* Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoïd cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J Virol* [S.I.], v. 69, n. 11, p. 7282-5, Nov 1995.

BOAVENTURA, V. S., *et al.* Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol*, v. 40, n. 10, p. 2830-6, Oct. 2010.

CACERES-DITTMAR, G., *et al.* Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* [S.I.], v. 91, n. 3, p. 500-5, Mar 1993.

CACOPARDO, B., *et al.* Prolonged Th2 cell activation and increased viral replication in HIV-*Leishmania* co-infected patients despite treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [S.I.], v. 90, n. 4, p. 434-5, Jul-Aug 1996.

CARVALHO, E. M., *et al.* Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill *Leishmania*. *Braz J Med Biol Res* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 85-92, 1988.

CARVALHO, E. M., *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* [S.I.], v. 56, n. 4, p. 315-25, Apr 1994.

CARVALHO, E. M., *et al.* Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol* [S.I.], v. 135, n. 6, p. 4144-8, Dec 1985.

CARVALHO, E. M., *et al.* Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect Immun* [S.I.], v. 33, n. 2, p. 498-500, Aug 1981.

CARVALHO, L. P., *et al.* Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar. *Gazeta Médica da Bahia* [S.I.], v. 75, n. 1, p. 57-65, Jan-Jun 2005.

CASADO, J. L., *et al.* Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [S.I.], v. 20, n. 3, p. 202-5, Mar 2001.

CHAN, D. C.; KIM, P. S. HIV entry and its inhibition. *Cell* [S.I.], v. 93, n. 5, p. 681-4, May 29 1998.

CHRUSCIAK-TALHARI, A., *et al.* Tegumentary leishmaniasis as the cause of immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient co-infected with human immunodeficiency virus and *Leishmania guyanensis*. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 81, n. 4, p. 559-64, Oct 2009.

CLERICI, M., *et al.* Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest [S.I.]*, v. 91, n. 3, p. 759-65, Mar 1993.

CLERICI, M., *et al.* Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4⁺ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest [S.I.]*, v. 84, n. 6, p. 1892-9, Dec 1989.

COFFIN, J. M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science [S.I.]*, v. 267, n. 5197, p. 483-9, Jan 27 1995.

COSTA, J. M., *et al.* [Spontaneous healing of leishmaniasis caused by *Leishmania viannia braziliensis* in cutaneous lesions]. *Rev Soc Bras Med Trop [S.I.]*, v. 23, n. 4, p. 205-8, Oct-Dec 1990.

CRUZ, I., *et al.* *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res [S.I.]*, v. 123, n. 3, p. 357-88, Mar 2006.

DA-CRUZ, A. M., *et al.* Cellular and humoral immune responses of a patient with American cutaneous leishmaniasis and AIDS. *Trans R Soc Trop Med Hyg [S.I.]*, v. 86, n. 5, p. 511-2, Sep-Oct 1992.

DALGLEISH, A. G., *et al.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature [S.I.]*, v. 312, n. 5996, p. 763-7, Dec 20-1985 Jan 2 1984.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg [S.I.]*, v. 95, n. 3, p. 239-43, May-Jun 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol [S.I.]*, v. 14, n. 5, p. 417-23, Sep-Oct 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis [S.I.]*, v. 27, n. 5, p. 305-18, Sep 2004.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol [S.I.]*, v. 97 Suppl 1, p. 3-15, Oct 2003.

FARIA, D. R., *et al.* Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun [S.I.]*, v. 73, n. 12, p. 7853-9, Dec 2005.

FAUCI, A. S. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science [S.I.]*, v. 239, n. 4840, p. 617-22, Feb 5 1988.

FAUCI, A. S., *et al.* Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med [S.I.]*, v. 124, n. 7, p. 654-63, Apr 1 1996.

FOLKS, T. M., *et al.* Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 86, n. 7, p. 2365-8, Apr 1989.

FRENCH, M. A. HIV/AIDS: immune reconstitution inflammatory syndrome: a reappraisal. *Clin Infect Dis* [S.I.], v. 48, n. 1, p. 101-7, Jan 1 2009.

GOMES-SILVA, A., *et al.* Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* [S.I.], v. 149, n. 3, p. 440-4, Sep 2007.

GRAZIOSI, C., *et al.* Comparative analysis of constitutive cytokine expression in peripheral blood and lymph nodes of HIV-infected individuals. *Res Immunol* [S.I.], v. 145, n. 8-9, p. 602-5; discussion 605-7, Oct-Dec 1994.

GRUTERS, R. A., *et al.* Selective loss of T cell functions in different stages of HIV infection. Early loss of anti-CD3-induced T cell proliferation followed by decreased anti-CD3-induced cytotoxic T lymphocyte generation in AIDS-related complex and AIDS. *Eur J Immunol* [S.I.], v. 20, n. 5, p. 1039-44, May 1990.

HARARI, A., *et al.* Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol* [S.I.], v. 174, n. 2, p. 1037-45, Jan 15 2005.

HEINZEL, F. P., *et al.* Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* [S.I.], v. 169, n. 1, p. 59-72, Jan 1 1989.

HELSETH, E., *et al.* Changes in the transmembrane region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein affect membrane fusion. *J Virol* [S.I.], v. 64, n. 12, p. 6314-8, Dec 1990.

KAPLAN, J. E., *et al.* Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* [S.I.], v. 30 Suppl 1, p. S5-14, Apr 2000.

KLATZMANN, D., *et al.* T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* [S.I.], v. 312, n. 5996, p. 767-8, Dec 20-1985 Jan 2 1984.

LINDOSO, J. A., *et al.* Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol* [S.I.], v. 160, n. 2, p. 311-8, Feb 2009.

LOPEZ-VELEZ, R. The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV. *Ann Trop Med Parasitol* [S.I.], v. 97 Suppl 1, p. 143-7, Oct 2003.

LOPEZ-VELEZ, R., *et al.* Decline of a visceral leishmaniasis epidemic in HIV-infected patients after the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Clin Microbiol Infect* [S.I.], v. 7, n. 7, p. 394-5, Jul 2001.

LYONS, S., *et al.* Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. *Trop Med Int Health* [S.I.], v. 8, n. 8, p. 733-9, Aug 2003.

MACKEWICZ, C. E., *et al.* CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J Clin Invest* [S.I.], v. 87, n. 4, p. 1462-6, Apr 1991.

MATTOS, M., *et al.* American cutaneous leishmaniasis associated with HIV infection: report of four cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* [S.I.], v. 10, n. 3, p. 218-25, May 1998.

MEDRANO, F. J., *et al.* The role of serology in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type-1. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 59, n. 1, p. 155-62, Jul 1998.

MELTZER, M. S., *et al.* Role of mononuclear phagocytes in the pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Annu Rev Immunol* [S.I.], v. 8, p. 169-94, 1990.

MOCROFT, A., *et al.* Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group. *Lancet* [S.I.], v. 352, n. 9142, p. 1725-30, Nov 28 1998.

MOORE, J. P., *et al.* Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* [S.I.], v. 68, n. 8, p. 5142-55, Aug 1994.

MURRAY, H. W., *et al.* Advances in leishmaniasis. *Lancet* [S.I.], v. 366, n. 9496, p. 1561-77, Oct 29-Nov 4 2005.

MURRAY, H. W., *et al.* Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *J Clin Invest* [S.I.], v. 72, n. 4, p. 1506-10, Oct 1983.

NIGRO, L., *et al.* In vitro production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from subjects coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 60, n. 1, p. 142-5, Jan 1999.

NIGRO, L., *et al.* CCR5 and CCR3 expression on T CD3+ lymphocytes from HIV/*Leishmania* co-infected subjects. *Med Microbiol Immunol* [S.I.], v. 196, n. 4, p. 253-5, Dec 2007.

OLIVIER, M., *et al.* The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. *Ann Trop Med Parasitol* [S.I.], v. 97 Suppl 1, p. 79-98, Oct 2003.

PAKKER, N. G., *et al.* Patterns of T-cell repopulation, virus load reduction, and restoration of T-cell function in HIV-infected persons during therapy with different antiretroviral agents. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* [S.I.], v. 16, n. 5, p. 318-26, Dec 15 1997.

PANTALEO, G.; FAUCI, A. S. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* [S.I.], v. 50, p. 825-54, 1996.

PARANJAPE, R. S. Immunopathogenesis of HIV infection. *Indian J Med Res* [S.I.], v. 121, n. 4, p. 240-55, Apr 2005.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis* [S.I.], v. 22, n. 1, p. 1-13, Jan 1996.

PINTADO, V., *et al.* Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore)* [S.I.], v. 80, n. 1, p. 54-73, Jan 2001.

PIRMEZ, C., *et al.* Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* [S.I.], v. 91, n. 4, p. 1390-5, Apr 1993.

POPOVIC, M., *et al.* Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* [S.I.], v. 224, n. 4648, p. 497-500, May 4 1984.

POSADA-VERGARA, M. P., *et al.* Tegumentary leishmaniasis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome in 2 patients with AIDS. *J Infect Dis* [S.I.], v. 192, n. 10, p. 1819-22, Nov 15 2005.

RABELLO, A., *et al.* *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol* [S.I.], v. 97 Suppl 1, p. 17-28, Oct 2003.

RIBEIRO-DE-JESUS, A., *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* [S.I.], v. 31, n. 1, p. 143-8, Jan 1998.

ROMAN, E., *et al.* CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function. *J Exp Med* [S.I.], v. 196, n. 7, p. 957-68, Oct 7 2002.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* [S.I.], v. 2, n. 11, p. 845-58, Nov 2002.

SALLUSTO, F., *et al.* Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* [S.I.], v. 401, n. 6754, p. 708-12, Oct 14 1999.

SALLUSTO, F., *et al.* Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* [S.I.], v. 187, n. 6, p. 875-83, Mar 16 1998.

SCOTT, P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* [S.I.], v. 68, n. 3, p. 369-72, Apr 1989.

SHELBURNE, S. A., 3RD, *et al.* Immune reconstitution inflammatory syndrome: emergence of a unique syndrome during highly active antiretroviral therapy. *Medicine (Baltimore)* [S.I.], v. 81, n. 3, p. 213-27, May 2002.

SINHA, S., *et al.* Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *Int J Dermatol [S.I.]*, v. 47, n. 12, p. 1263-70, Dec 2008.

TINDALL, B.; COOPER, D. A. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS [S.I.]*, v. 5, n. 1, p. 1-14, Jan 1991.

TREMBLAY, M., *et al.* *Leishmania* and the pathogenesis of HIV infection. *Parasitol Today [S.I.]*, v. 12, n. 7, p. 257-61, Jul 1996.

TURCO, S. J. Adversarial relationship between the leishmania lipophosphoglycan and protein kinase C of host macrophages. *Parasite Immunol [S.I.]*, v. 21, n. 12, p. 597-600, Dec 1999.

WOLDAY, D., *et al.* HIV-1 inhibits *Leishmania*-induced cell proliferation but not production of interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha. *Scand J Immunol [S.I.]*, v. 39, n. 4, p. 380-6, Apr 1994.

WOLDAY, D., *et al.* *Leishmania*-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. *Parasitol Today [S.I.]*, v. 15, n. 5, p. 182-7, May 1999.

WU, L., *et al.* CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature [S.I.]*, v. 384, n. 6605, p. 179-83, Nov 14 1996.

ZWINGENBERGER, K., *et al.* Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production. *Clin Immunol Immunopathol [S.I.]*, v. 57, n. 2, p. 242-9, Nov 1990.

APÊNDICE I

A quantificação das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-4 e IL-10 no plasma dos pacientes coinfectados por HIV e *Leishmania* e infectados apenas por *Leishmania* foi realizado durante o período do mestrado. Os resultados serão publicados no artigo intitulado: *Th1/Th2 cytokine profile in HIV and Leishmania co-infected patients in Brazil*, na revista *Clinical and Vaccine Immunology (CVI)*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da infecção pelo HIV no perfil de citocinas dos pacientes com leishmaniose cutânea infectados por HIV. Neste artigo foram também descritas as produções de IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 e IL-13 pelo PBMC após estímulo com os antígenos de *Leishmania* ou o antígeno p24 do HIV, realizada previamente pelo nosso grupo.

TH1/TH2 CYTOKINE PROFILE IN HIV AND LEISHMANIA CO-INFECTED PATIENTS IN BRAZIL

Maria Zilma Andrade Rodrigues¹, Maria Fernanda Rios Grassi², Sanjay Mehta³, Xing-Quan Zhang³, Luana Leandro Gois², Robert T. Schooley³ and Roberto Badaro^{1,3}.

1-Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

2-Oswaldo Cruz Foundation- FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brazil

3- University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA

Running Head Title: Cytokine profile in HIV/*Leishmania* co-infection

Abstract

To evaluate the effects of HIV on immune responses in cutaneous leishmaniasis (CL), we quantified cytokine levels from plasma and stimulated PBMCs from individuals infected with HIV and/or CL. IFN- γ , IL-13, and the ratio of IFN- γ /IL-10 produced in response to stimulation with soluble *Leishmania* antigens were significantly lower in HIV/*Leishmania* co-infected patients.

Key words: *Leishmania*, HIV, co-infection, cytokines.

Manuscript

The clinical outcome of *Leishmania* infection depends on the balance between Th1 and Th2 cytokines (4, 9, 31). HIV infection alters the Th1/Th2 balance in patients with visceral leishmaniasis, resulting in increased Th2 cytokine responses and decreased levels of IL-12 and IL-18 (31). Here we evaluate the effects of HIV on cytokine responses in cutaneous leishmaniasis (CL).

Eight HIV-1 infected patients with CL, 9 HIV-1 seronegative CL patients and 21 HIV-infected patients were studied. Institutional review board approval was obtained from Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), FIOCRUZ and UCSD's Human Research Protection Program.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated by Ficoll-Hypaque centrifugation (Amersham Biosciences) and resuspended in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 2 mM L-glutamine, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) (GIBCO) and 5 % heat-inactivated human AB serum. Cells were stimulated with soluble *Leishmania* antigen (SLA) at 10 µg/ml (11), HIV p24 antigen at 2 µg/ml (Protein Sciences, Meriden, CT), or medium alone and incubated for 48 hours at 37 °C with 5 % CO₂. Supernatants were collected, stored at -20 °C and analyzed for IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, TNF-α, and IFN-γ using the Luminex® 200 system (Austin, TX, USA) (8). The dynamic range of this multiplex assays was from 0.2 pg/ml to 32,000 pg/ml. Only 6 HIV-1 infected subjects with CL, 9 HIV-1 subjects and 5 subjects with CL had supernatant analyzed from IL-13. Plasma samples were analyzed using the human Th1/Th2 cytokine kit II, BD® cytometric bead array (San Jose, CA, USA) (6). IFN-γ/IL-10, IFN-γ/IL-13 and TNF-α/IL-10 ratios were calculated using measured values. Patients who had undetectable levels of cytokines were excluded of the cytokine ratio analysis. Flow cytometry was performed by FACSsort (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA.)

Statistical analysis was performed using Prism® (GraphPad, San Diego) software. Supernatant cytokine concentrations were normalized by subtracting the amount of cytokine produced in culture with media alone. The Mann-Whitney Test was used for median comparisons.

Epidemiological and clinical characteristics of the patients with CL are shown in **Table 1**. The median CD4⁺ T cell count in the HIV group was higher than in the HIV/*Leishmania* co-infected group (415, range 108 to 1005 cells/mm³ vs. 203, range 78 to 615 cells/mm³, p=0.05). The median plasma viral load was similar between groups [\log_{10} 3.3 (1.9 to 5.8) copies/ml vs. \log_{10} 4.8 (p=0.3)].

PBMCs from HIV-1 infected individuals with CL produced less IFN- γ and IL-13 in response to SLA than those from HIV-1 seronegative patients with CL. (**Supplementary Table 1 and Figure 1**) A significant difference in the median IFN- γ /IL-10 ratio between co-infected individuals (0.2, range 0.1 to 0.4) and those with CL alone (4.7, range 0.3 to 152.5) (p=0.004) was also noted. (**Figure 1**)

PBMCs from patients with HIV/*Leishmania* co-infection produced significantly more IFN- γ (median, 49 vs. 5.6 pg/mL, p=0.02) and IL-10 (median, 227 vs. 0.0 pg/mL, p=0.03) than those with HIV-1 infection alone in response to HIV-1 p24 Ag. (**Figure 2**) Except for one outlier, the IFN- γ /IL-10 ratio was similar in the two groups (**Figure 2**).

HIV-1 potentiates *Leishmania* infection in humans, and *vice versa* (30). Most reports of HIV infection unleashing leishmaniasis as an opportunistic infection have been associated with viscerotropic *Leishmania* strains (1, 13, 23, 24). However, scattered studies have reported more aggressive manifestations of CL, such as relapsing and diffuse cutaneous disease, in HIV infected patients (15, 19, 22, 25, 26). Mucocutaneous disease may also be more severe in the setting of HIV co-infection (2, 20).

The balance between inflammatory and regulatory cytokines creates a controlled immune response that promotes parasite killing but not tissue destruction during CL infection (5, 7). In asymptomatic *Leishmania* infections and those with limited cutaneous pathology, levels of IFN- γ and IL-10 are balanced. In contrast, in mucocutaneous leishmaniasis, high levels of IFN- γ , TNF- α and low levels of IL-10 are associated with destruction of the mucous membranes in the nose, mouth and throat cavities and surrounding tissues (14).

In contrast to both visceral leishmaniasis and HIV where IFN- γ production is decreased (10, 12, 17), levels of IFN- γ measured at the lesion and from circulating PBMCs during CL infection remain close to normal (21). This study demonstrates that HIV-1 infected CL patients produce less IFN- γ in response to SLA compared to HIV-1

seronegative CL patients. While many cytokine responses are blunted in HIV-1 infection, in this study the IL-10 response was not decreased in the co-infected subjects, resulting in a decreased IFN- γ /IL-10 ratio of cytokine production. Although production of the Th2 cytokine IL-13 was significantly lower in the co-infected group, there was a trend for the IFN- γ /IL-13 ratio to also be decreased, mirroring the IFN- γ /IL-10 ratio (Data not shown). Alterations in the Th1/Th2 cytokine ratios may be a mechanism by which more severe cutaneous disease develops in HIV-1/*Leishmania* co-infection.

The impairment in IFN- γ production appears to be specific to *Leishmania* antigens, since despite lower CD4⁺ T-cell counts and higher median HIV-1 viral loads in the HIV-*Leishmania* co-infected subjects, PBMCs from co-infected patients produced more IFN- γ in response to HIV-1 p24 antigen than PBMCs from subjects only infected with HIV-1. Infection with cutaneous strains of *Leishmania* results in potent IFN- γ responses (27), and this may explain the discrepancy. Other potential explanations include: cross priming of the HIV specific T-cells by *Leishmania* infection, or differences in T-cell functionality depending upon the phase of immune recovery in antiretroviral treated patients (16, 18, 28-30). Due to the cross sectional nature of our study, we are unable to elucidate the mechanism involved here.

In HIV seronegative patients, PBMCs from subjects with mucocutaneous leishmaniasis produce higher levels of TNF- α than subjects with cutaneous disease (5). HIV-infected individuals have higher levels of circulating TNF- α than uninfected subjects, and this may contribute to the more severe mucosal disease seen in co-infection (3). Although we observed a slight trend towards higher levels of TNF- α in response to SLA in the HIV/*Leishmania* co-infected group compared to the subjects with CL alone, the TNF- α /IL-10 ratio was similar in both groups. Although we speculate that an altered TNF- α /IL-10 ratio in co-infected individuals may contribute to the increased dermatopathology seen in these individuals, our cohort did not have enough power to detect this effect.

In summary, the altered ratio of inflammatory and regulatory cytokines creates a milieu that supports replication of the *Leishmania* parasites. These alterations may explain how disseminated cutaneous infection and visceralization of species typically causing only cutaneous disease may occur in the setting of HIV and *Leishmania* co-infection.

SLA was kindly provided by Dr Claudia Brodskyn, Fiocruz-Bahia. Supported by the UCSD Center for AIDS Research, NIH grant P30AI036214.

Reference List

1. **Alvar, J., P. Aparicio, A. Aseffa, M. Den Boer, C. Canavate, J. P. Dedet, L. Gradoni, R. Ter Horst, R. Lopez-Velez, and J. Moreno.** 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* **21**:334-59, table of contents.
2. **Amato, V. S., A. C. Nicodemo, J. G. Amato, M. Boulos, and V. A. Neto.** 2000. Mucocutaneous leishmaniasis associated with HIV infection treated successfully with liposomal amphotericin B (AmBisome). *J Antimicrob Chemother* **46**:341-2.
3. **Aukrust, P., N. B. Liabakk, F. Muller, E. Lien, T. Espevik, and S. S. Froland.** 1994. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) and soluble TNF receptors in human immunodeficiency virus type 1 infection--correlations to clinical, immunologic, and virologic parameters. *J Infect Dis* **169**:420-4.
4. **Bacellar, O., A. D'Oliveira, Jr., S. Jeronimo, and E. M. Carvalho.** 2000. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* **12**:1228-31.
5. **Bacellar, O., H. Lessa, A. Schriefer, P. Machado, A. Ribeiro de Jesus, W. O. Dutra, K. J. Gollob, and E. M. Carvalho.** 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* **70**:6734-40.
6. **BD.** 2010. BD Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine Instruction Manual, vol. 551809. BD.
7. **Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach, and D. L. Sacks.** 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* **420**:502-7.
8. **Bio-rad.** 2010. Bio-plex Suspension Array System Tech note 3157. *In* Bio-rad (ed.).
9. **Bourreau, E., J. Gardon, R. Pradinaud, H. Pascalis, G. Prevot-Linguet, A. Karimnia, and L. Pascal.** 2003. Th2 responses predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and precede the development of Th1 responses. *Infect Immun* **71**:2244-6.
10. **Carvalho, E. M., R. Badaro, S. G. Reed, T. C. Jones, and W. D. Johnson, Jr.** 1985. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* **76**:2066-9.

11. **Carvalho, E. M., W. D. Johnson, E. Barreto, P. D. Marsden, J. L. Costa, S. Reed, and H. Rocha.** 1985. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol* **135**:4144-8.
12. **Cauda, R., S. K. Tying, E. Tamburrini, G. Ventura, M. Tambarello, and L. Ortona.** 1987. Diminished interferon gamma production may be the earliest indicator of infection with the human immunodeficiency virus. *Viral Immunol* **1**:247-58.
13. **Cruz, I., J. Nieto, J. Moreno, C. Canavate, P. Desjeux, and J. Alvar.** 2006. *Leishmania/HIV* co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* **123**:357-88.
14. **Gomes-Silva, A., R. de Cassia Bittar, R. Dos Santos Nogueira, V. S. Amato, M. da Silva Mattos, M. P. Oliveira-Neto, S. G. Coutinho, and A. M. Da-Cruz.** 2007. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* **149**:440-4.
15. **Guimaraes, L. H., P. R. Machado, E. L. Lago, D. J. Morgan, A. Schriefer, O. Bacellar, and E. M. Carvalho.** 2009. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **103**:712-5.
16. **Hardy, G. A., N. Imami, A. K. Sullivan, A. Pires, C. T. Burton, M. R. Nelson, B. G. Gazzard, and F. M. Gotch.** 2003. Reconstitution of CD4+ T cell responses in HIV-1 infected individuals initiating highly active antiretroviral therapy (HAART) is associated with renewed interleukin-2 production and responsiveness. *Clin Exp Immunol* **134**:98-106.
17. **Holaday, B. J., M. M. Pompeu, S. Jeronimo, M. J. Texeira, A. Sousa Ade, A. W. Vasconcelos, R. D. Pearson, J. S. Abrams, and R. M. Locksley.** 1993. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. *J Clin Invest* **92**:2626-32.
18. **Imami, N., C. Antonopoulos, G. A. Hardy, B. Gazzard, and F. M. Gotch.** 1999. Assessment of type 1 and type 2 cytokines in HIV type 1-infected individuals: impact of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**:1499-508.
19. **Lindoso, J. A., R. N. Barbosa, M. P. Posada-Vergara, M. I. Duarte, L. K. Oyafuso, V. S. Amato, and H. Goto.** 2009. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol* **160**:311-8.
20. **Mattos, M., A. Caiza, O. Fernandes, A. J. Goncalves, C. Pirmez, C. S. Souza, and M. P. Oliveira-Neto.** 1998. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV infection: report of four cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **10**:218-25.
21. **Pirmez, C., M. Yamamura, K. Uyemura, M. Paes-Oliveira, F. Conceicao-Silva, and R. L. Modlin.** 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* **91**:1390-5.

22. **Posada-Vergara, M. P., J. A. Lindoso, J. E. Tolezano, V. L. Pereira-Chiocola, M. V. Silva, and H. Goto.** 2005. Tegumentary leishmaniasis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome in 2 patients with AIDS. *J Infect Dis* **192**:1819-22.
23. **Rabello, A., M. Orsini, and J. Disch.** 2003. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol* **97 Suppl 1**:17-28.
24. **Redhu, N. S., A. Dey, V. Balooni, and S. Singh.** 2006. *Leishmania*-HIV co-infection: an emerging problem in India. *AIDS* **20**:1213-5.
25. **Rosatelli, J. B., C. S. Souza, F. A. Soares, N. T. Foss, and A. M. Roselino.** 1998. Generalized cutaneous leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **10**:229-32.
26. **Schraner, C., B. Hasse, U. Hasse, D. Baumann, A. Faeh, G. Burg, F. Grimm, A. Mathis, R. Weber, and H. F. Gunthard.** 2005. Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. *Clin Infect Dis* **40**:e120-4.
27. **Turgay, N., I. C. Balcioglu, S. O. Toz, Y. Ozbek, and S. L. Jones.** Quantiferon-*Leishmania* as an epidemiological tool for evaluating the exposure to *Leishmania* infection. *Am J Trop Med Hyg* **83**:822-4.
28. **Valdez, H., K. Y. Smith, A. Landay, E. Connick, D. R. Kuritzkes, H. Kessler, L. Fox, J. Spritzler, J. Roe, M. B. Lederman, H. M. Lederman, T. G. Evans, M. Heath-Chiozzi, and M. M. Lederman.** 2000. Response to immunization with recall and neoantigens after prolonged administration of an HIV-1 protease inhibitor-containing regimen. ACTG 375 team. AIDS Clinical Trials Group. *AIDS* **14**:11-21.
29. **Wendland, T., H. Furrer, P. L. Vernazza, K. Frutiger, A. Christen, L. Matter, R. Malinverni, and W. J. Pichler.** 1999. HAART in HIV-infected patients: restoration of antigen-specific CD4 T-cell responses in vitro is correlated with CD4 memory T-cell reconstitution, whereas improvement in delayed type hypersensitivity is related to a decrease in viraemia. *AIDS* **13**:1857-62.
30. **Wolday, D., N. Berhe, H. Akuffo, and S. Britton.** 1999. *Leishmania*-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. *Parasitol Today* **15**:182-7.
31. **Wolday, D., N. Berhe, S. Britton, and H. Akuffo.** 2000. HIV-1 alters T helper cytokines, interleukin-12 and interleukin-18 responses to the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *AIDS* **14**:921-9.

Table 1. Clinical and epidemiological characteristics of the *Leishmania*/HIV co-infected and *Leishmania* patients

Patients ID	Age (yr)	Gender	Clinical status	T CD4⁺ Lymphocytes (cells/mm ³)	Viral Load (log ₁₀ copies/ml)
HIV/Leish3	42	F	Cutaneous mucosal active	93	5.4
HIV/Leish5	22	F	Cutaneous active	291	1.9
HIV/Leish6	36	M	Cutaneous treated	165	5.3
HIV/Leish8	62	F	Cutaneous treated	457	2.7
HIV/Leish9	59	M	Cutaneous active	78	5.0
HIV/Leish12	36	M	Cutaneous active	615	1.9
HIV/Leish13	36	M	Cutaneous active	104	5.0
HIV/Leish14	25	M	Cutaneous mucosal active	241	4.6
Median	36			203*	4.8
Range	(22-62)			(78-615)	(1.9-5.4)
Leish24	69	M	Cutaneous mucosa active		
Leish28	37	M	Cutaneous active		
Leish31	20	M	Cutaneous active		
Leish32	22	F	Cutaneous active		
Leish33	66	M	Cutaneous active		
Leish35	63	M	Cutaneous active		
Leish36	27	M	Cutaneous mucosal active		
Leish37	76	M	Cutaneous active		
Leish38	38	F	Cutaneous mucosal active		
Median	38				
Range	(20-76)				

In HIV infected group (n=22), the median of CD4⁺ T cell subset was 415 cell/mm³ (range 108 to 1005) and the median of viral load was 4.8 log₁₀ copies/ml (range 1.9 to 5.8). The median of age was

39 years (range 24 to 72) and 62 % of HIV-infected patients were male. *: Differences were considered significant when $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test).

Supplementary Table 1. Levels of Th1/Th2 cytokines from *Leishmania*-infected and HIV/*Leishmania* co-infected patients, obtained from plasma and supernatant cultures of SLA-stimulated PBMC. Different methods were used for measuring cytokine levels in the supernatant and plasma so that data are not directly comparable.

Patients ID	IFN- γ (pg/mL)		TNF- α (pg/mL)		IL-10 (pg/mL)		Ratio IFN- γ /IL-10	
	Supernatant	Plasma	Supernatant	Plasma	Supernatant	Plasma	Supernatant	Plasma
HIV/Leish3	0.0	20	11.1	17.8	29.7	9.3	N/A	2.15
HIV/Leish5	15.7	6.2	350.8	8.9	100.0	5.3	0.2	1.16
HIV/Leish6	62.9	9.2	825.7	11.1	263.2	5.3	0.2	1.73
HIV/Leish8	3.2	ND	350.3	ND	65.9	ND	0.05	ND
HIV/Leish9	990.9	6.2	557.7	6.7	0.0	8.0	N/A	0.77
HIV/Leish12	5.9	27.7	83.2	15.6	76.1	10.7	0.1	2.58
HIV/Leish13	62.7	0.0	2252.0	28.9	1236.6	22.7	0.05	N/A
HIV/Leish14	55.2	10.8	0.0	8.9	143.7	5.3	0.4	2.03
Median	35.4*	9.2*	350.2	11.1	88.1	8.0	0.1*	1.88
Range	(0.0-990.9)	(0.0-27.7)	(0.0-2252.0)	(6.7-28.9)	(0.0-1236.6)	(5.3-22.7)	(0.05-0.4)	(0.0-2.58)
Leish24	46.2	26.2	0.0	13.3	174.5	8.0	0.3	3.3
Leish28	16773.1	30.8	1081.8	17.8	110.0	9.3	152.5	3.3
Leish31	344.4	20.0	153.2	8.9	171.5	5.3	2.0	3.8
Leish32	2277.2	23.1	952.4	17.8	229.5	12.0	9.9	1.9
Leish33	291.7	13.8	169.1	8.9	68.4	6.7	4.3	2.1
Leish35	32744	27.7	39.7	17.8	398.8	12.0	82.1	2.3
Leish36	1268.7	24.4	3106.7	13.3	0.0	10.7	N/A	2.3
Leish37	153.6	20.0	178.3	13.3	226.1	6.7	0.7	3.0
Leish38	1881.1	7.7	1588.1	13.3	367.1	5.3	5.1	1.5
Median	1268.7	23.1	178.3	13.3	174.5	8.0	4.7	2.3
Range	(46.2-32744)	(7.7-30.8)	(0.0-3106.7)	8.9-17.8)	(0.0-398.8)	(5.3-12.0)	(0.3-152.5)	(1.5-3.8)

N/A – Unable to determine; ND – Not done; * Significant differences between *Leishmania*-infected and HIV/*Leishmania* co-infected patients. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney U test).

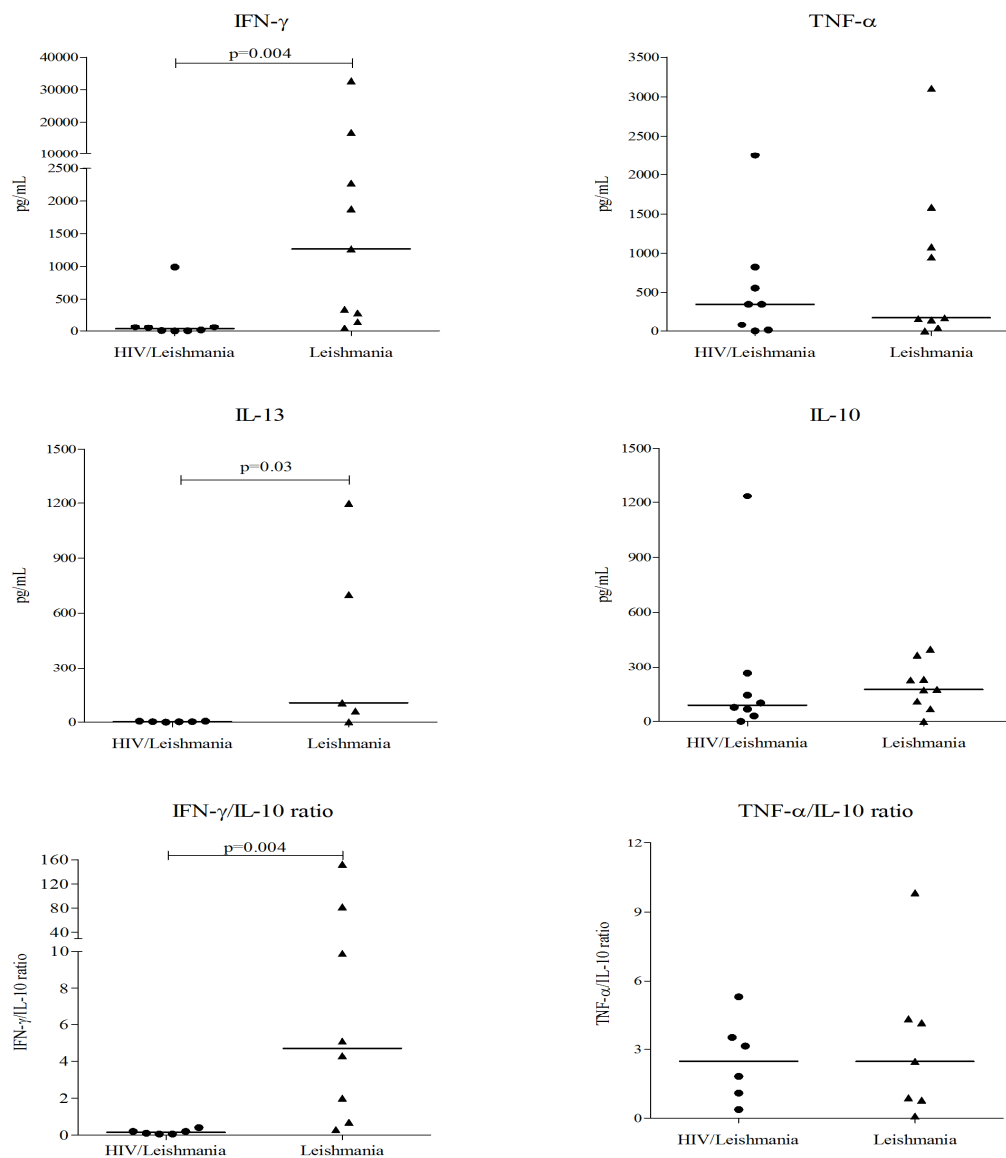


Figure 1. Graphs demonstrating IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 production by PBMCs from HIV/*Leishmania* co-infected (n=8) and *Leishmania* mono-infected (n=9) patients; and IL-13 production by PBMCs from HIV/*Leishmania* co-infected (n=6) and *Leishmania* mono-infected (n=5) patients. PBMC were stimulated *in vitro* with soluble *Leishmania* antigen (SLA) and supernatants were collected after 48 hours. In the last two panels the ratio of IFN- γ /IL-10 and TNF- α /IL-10 cytokine production between the HIV/*Leishmania* co-infected (n=6) and *Leishmania* mono-infected (n=8 and 7, respectively) patients is demonstrated. Patients who had undetectable levels of cytokines (HIV/Leish3 and HIV/Leish9) were excluded of the cytokine ratio analysis. Median values are indicated by horizontal bars. Mann-Whitney test was used to compare groups. For the individual cytokines, significant differences were found between groups for IFN- γ and IL-13 ($p=0.004$ and $p=0.03$, respectively). A significant difference was also found for the IFN- γ /IL-10 ratio ($p=0.004$), but not the TNF- α /IL-10 ratio.

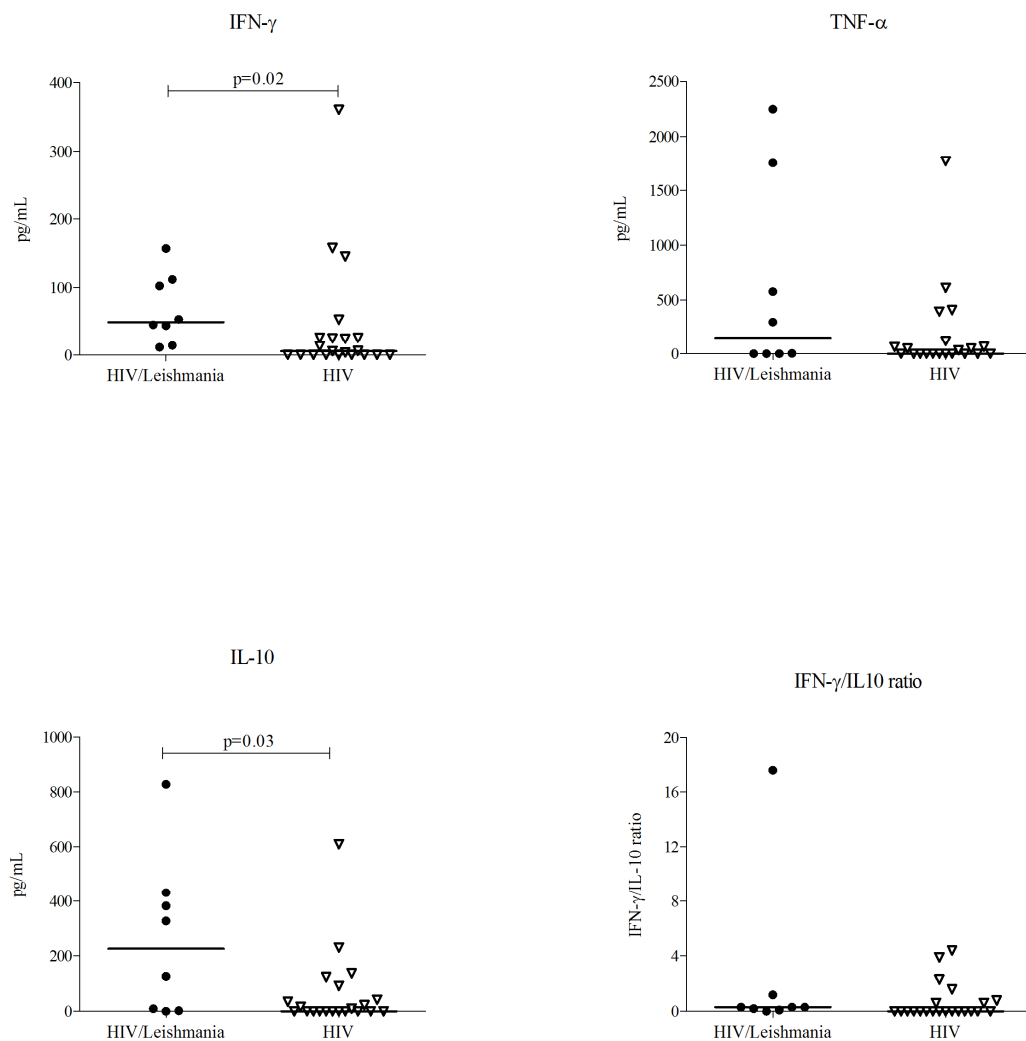


Figure 2. Graphs demonstrating IFN- γ , TNF- α , IL-4, and IL-10 production by PBMC from HIV infected (n=21), and HIV/*Leishmania* co-infected (n=8) patients. PBMC were stimulated *in vitro* with HIV p24 protein and supernatants were collected after 48 hours. In the last panel the ratio of IFN- γ /IL-10 cytokine production between the HIV/*Leishmania* co-infected (n=7) and HIV mono-infected (n= 7) patients is demonstrated. Medians are indicated by horizontal bars. Mann Whitney test was used to compare groups. For the individual cytokines, significant differences between groups were found for IFN- γ and IL-10 ($p=0.02$, and $p=0.03$ respectively). A significant difference was not found between the groups for the IFN- γ /IL-10 ratio ($p=0.07$).