

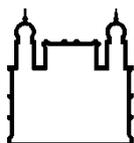
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Medicina Tropical

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICO-LABORATORIAIS E
IMUNOLÓGICOS E SUA RELAÇÃO COM RECIDIVA NA
LEISHMANIOSE VISCERAL

RENATA CAETANO KUSCHNIR

Rio de Janeiro
Junho de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

RENATA CAETANO KUSCHNIR

Avaliação de parâmetros clínico-laboratoriais e imunológicos e sua relação com recidiva na leishmaniose visceral

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

Orientadoras: Profa. Dra. Alda Maria Da-Cruz
Profa. Dra. Joanna Reis Santos de Oliveira

RIO DE JANEIRO

Junho de 2020

Kuschnir, Renata Caetano.

Avaliação de parâmetros clínico-laboratoriais e imunológicos e sua relação com recidiva na leishmaniose visceral / Renata Caetano Kuschnir. - Rio de Janeiro, 2020.
xiv, 97 f.; il.

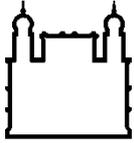
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2020.

Orientadora: Alda Maria da Cruz.

Co-orientadora: Joanna Reis Santos de Oliveira.

Bibliografia: f. 70-84

1. Leishmaniose Visceral. 2. Recidiva . 3. Imunologia . 4. Evolução Clínica. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: RENATA CAETANO KUSCHNIR

Avaliação de parâmetros clínico-laboratoriais e imunológicos e sua relação com recidiva na leishmaniose visceral

ORIENTADORES: Profa. Dra Alda Maria Da-Cruz
Profa. Dra Joanna Reis Santos de Oliveira

Aprovada em: 03/06/2020

EXAMINADORES:

Membro titular (Presidente): Prof. Dr Renato Porrozzì – Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz RJ

Membro titular: Prof. Dra. Maria Inês Pimentel – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas / Fiocruz RJ

Membro titular: Prof. Dra. Dorcas Costa – Universidade Federal do Piauí - PI

Suplente: Prof. Dra. Glaucia Cota – Instituto René Rachou / Fiocruz MG

Suplente: Prof. Dra. Simone Ladeia – Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz RJ

Rio de Janeiro, 03 de junho de 2020

Dedico este trabalho à minha avó, que aprendeu a ler olhando a escola pelo lado de fora da janela.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, tenho o dever de agradecer às instituições públicas de ensino que me trouxeram até aqui. Desde os sete anos de idade a educação pública é parte da minha vida e espero ir devolvendo este investimento aos poucos para a sociedade.

Agradeço aos meus pais e à minha irmã, porque sempre vivi em um ambiente de amor e de incentivo. Sei exatamente o que a palavra “família” significa e tenho a consciência de que tenho muita sorte. Obrigada por tudo, desde sempre.

Agradeço ao Felipe, porque foi a melhor companhia que eu poderia ter tido ao longo desses dois anos e é a melhor parceria que eu poderia ter para a vida.

Agradeço aos meus familiares e aos meus amigos, que permitem que o dia a dia seja mais leve, mais doce e repleto de carinho e cuidado.

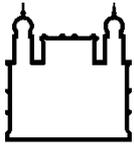
Agradeço às minhas orientadoras, Dra. Alda e Dra. Joanna, que tiveram a disponibilidade e a paciência de me ensinar o que eu precisava para chegar até aqui. Em um país no qual as mulheres e as ciências não são valorizadas, vocês são inspiração: obrigada por serem minhas guias nesse percurso.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, incluindo Bruna Sender e Pamela Lima. Em especial, gostaria de agradecer a Gabriela Correa e Castro e Maria Luciana Silva Freitas, agora mestre e doutora respectivamente, que foram fundamentais nesse trabalho.

Agradeço a todos os colaboradores: Carmem Giacioia-Gripp, Dra. Gáucia Cota, Dra. Ana Rabello, Dr. Leonardo Soares, Dra. Maria Rita Teixeira, Ludmilla de Paula, Josafá Ferreira, Miriam Brum e Mirtes Natalina.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Quem desconfia fica sábio”
Guimarães Rosa



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

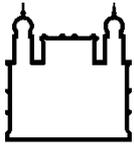
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Dissertação de mestrado em Medicina Tropical

RESUMO

Avaliação de parâmetros clínico-laboratoriais e imunológicos e sua relação com recidiva na leishmaniose visceral
Renata Caetano Kuschnir

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave e potencialmente fatal. O Brasil é um dos países endêmicos, com cerca de 4000 casos notificados em 2017. A diminuição na contagem de linfócitos T CD4⁺, ativação policlonal de linfócitos B, aumento de LPS plasmático e elevados níveis de citocinas inflamatórias parecem estar envolvidos na imunopatogenia da fase ativa da LV. Além disso, vários marcadores, como níveis elevados de IL-6, IL-8, TNF, IL-1 β , CD14 solúvel (sCD14), e imunoglobulinas específicas anti-*Leishmania*, bem como níveis baixos de leptina já foram associados à LV grave. Entretanto, apesar dos relatos de que as recidivas ocorrem em cerca de 4-5% dos pacientes de LV não associada à infecção pelo HIV, e esplenomegalia, tempo de tratamento e trombocitopenia estarem sendo associados a esse desfecho clínico, pouco se sabe sobre os fatores que são subjacentes às recidivas. Esse estudo teve como objetivo identificar parâmetros laboratoriais e imunológicos associados a recidivas na LV. Para isso, foram acompanhados prospectivamente pacientes com LV ativa recidivantes (R, n=5) e não recidivantes (NR, n=10). Os participantes foram diagnosticados no Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte – MG e foram avaliados em três momentos: fase ativa (FA), imediatamente após o tratamento (pós-tto) e seis meses após o tratamento (6mpt). Alguns foram avaliados após 12 meses de tratamento (12mpt). Dez indivíduos sadios, de área endêmica e não endêmica, também foram incluídos como controles. Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários médicos. Avaliou-se a contagem absoluta de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, dosagem de IgG, IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* e os níveis plasmáticos de IL-6. Esses dados foram correlacionados às informações clínico-laboratoriais dos respectivos pacientes. A sintomatologia na fase ativa da LV foi similar em ambos os grupos, porém, o grupo NR apresentou marcadores de acometimento orgânico mais pronunciados em relação ao R, como piores níveis de trombocitopenia, elevação de transaminases, hiperbilirrubinemia na FA (p<0,05). Nesta fase, todos os pacientes apresentaram baixas contagens de células T CD4⁺, contudo, os pacientes NR apresentaram ganho desse tipo celular de forma mais acentuada que pacientes R no pós-tto (p<0,05). Além disso, houve uma redução significativa dos níveis de IgG3 ao longo do acompanhamento no grupo NR em relação ao R, especialmente aos 6mpt (p<0,05). Ademais, os níveis de IgG3 se correlacionaram positivamente com número de episódios de LV aos 6 mpt e negativamente com as contagens de T CD4⁺ ao longo do acompanhamento clínico. Níveis elevados de IL-6 foram observados na fase ativa da LV de ambos os grupos e se correlacionaram negativamente com o número de linfócitos totais e níveis de albumina (p<0,05). Diante disso, a IgG3 se mostrou como um possível biomarcador de recidivas e a redução de seus níveis séricos parece estar relacionada à remissão clínica da LV. Por fim, a recuperação das contagens de T CD4⁺ de forma mais pronunciada em pacientes NR indicam que o grau de comprometimento imunológico dos pacientes com LV está associada à ocorrência de recidivas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Master dissertation in Medicina Tropical

ABSTRACT

Evaluation of clinical, laboratory and immunological parameters and their relationship with relapse in visceral leishmaniasis **Renata Caetano Kuschnir**

Visceral leishmaniasis (VL) is a serious and potentially fatal disease. Brazil is one of the countries with larger number of cases, with about 4,000 cases in 2017. Some factors seem to be involved in the immunopathogenesis of the active phase of VL, such as the decrease in the count of lymphocytes T CD4+, polyclonal activation of lymphocytes B, increase in plasma LPS due to probable bacterial translocation through the intestinal barrier and high levels of inflammatory cytokines. In addition, the following factors have already been associated with severe VL: high levels of soluble CD14 (sCD14), IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β and subclasses of specific anti-*Leishmania* immunoglobulins, as well as low levels of leptin. Despite reports that relapses occur in about 4-5% of VL patients not infected with HIV, and splenomegaly, duration of treatment and thrombocytopenia are associated with this clinical outcome, little is known about the factors that underlie relapses. This study aimed to prospectively evaluate immunological, clinical and laboratory parameters in relapsing (R, n= 5) and non-relapsing (NR, n= 10) patients and correlate them with relapses in VL. To investigate possible factors associated with this outcome, the patients with active VL, diagnosed at Eduardo de Menezes Hospital, Belo Horizonte – MG – Brazil, were evaluated in three moments: active phase (AP), immediately after treatment (AFT-TT) and six months after treatment (6mat). Some were evaluated after 12 months of treatment (12mat). Ten healthy individuals from endemic and non-endemic areas were also included as control group. Clinical data were taken from patients' medical records. In addition, absolute T CD4+ and CD8+ lymphocytes counts, IgG anti-*Leishmania* immunoglobulins and their IgG1 and IgG3 subclasses, and plasma IL-6 levels were evaluated. Data was correlated with the clinical and laboratory information of the respective patients. The symptoms in the AP of VL were similar in both groups, however the NR group presented more pronounced organic involvement markers in relation to the R group, such as worse levels of thrombocytopenia, elevated transaminases and hyperbilirubinemia in AP ($p < 0.05$). At this stage, all patients had low T CD4+ cell counts, however NR patients showed a more marked gain of this cell type than R patients in the AFT-TT period ($p < 0.05$). In addition, it was possible to identify a significant reduction in IgG3 levels during the follow-up in the NR group compared to R, especially at 6mpt ($p < 0.05$). IgG3 levels were also correlated positively with the number of VL episodes at 6 mpt and negatively with T CD4+ counts throughout clinical follow-up. Elevated levels of IL-6 were observed in the active phase of VL of both groups and correlated negatively with the number of total lymphocytes and levels of albumin ($p < 0.05$). Considering this, IgG3 may be a biomarker of recurrences and the reduction in its serum levels seems to be related to the clinical remission of VL. Finally, the recovery of T CD4+ cell counts in more pronounced way in NR patients reinforces that the degree of immunological impairment in patients with VL is associated with recurrence.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	15
1.1. Epidemiologia da leishmaniose visceral	15
1.2. Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	16
1.3. Apresentação clínica, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral	18
1.4. Imunopatogênese da leishmaniose visceral	23
1.6. Recidivas na leishmaniose visceral	31
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo Geral	35
3.2. Objetivos Específicos.....	35
4. METODOLOGIA	36
4.1. Casuística.....	36
4.2. Obtenção de material biológico para ensaios laboratoriais	37
4.3. Quantificação das contagens absolutas de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	38
4.4. Dosagem sérica de Imunoglobulinas G (IgG) e subclasses IgG1 e IgG3 anti- <i>Leishmania</i>	39
4.5. Dosagem de citocinas	39
4.6. Análise estatística.....	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com leishmaniose visceral	41
5.2. Avaliação prospectiva dos níveis de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ antes e após o tratamento da leishmaniose visceral	48
5.3. Avaliação prospectiva da resposta de linfócitos B por meio da quantificação dos níveis IgG, IgG1 e IgG3 anti- <i>Leishmania infantum</i> em pacientes com leishmaniose visceral	52
5.4. Avaliação prospectiva dos níveis IL-6 em pacientes com leishmaniose visceral	56

6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
9. ANEXOS	85
9.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	85
9.2. Aprovações no Comitê de Ética em Pesquisas com seres humanos (IOC, HEM/FHEMIG, Centro de Pesquisa René Rachou)....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Mapa mundial da endemicidade da leishmaniose visceral, 2016. Adaptado de WHO 2018.....15**
- Figura 2: Evolução de índices hematimétricos, leucograma e plaquetas e função renal dos pacientes de leishmaniose visceral não-recidivantes (NR) e recidivantes (R). Comparação entre as medianas dos valores de fases ativa (FA) e após o tratamento imediato (pós-tto) dos pacientes NR (A e C) e R (B e D). * $p < 0,05$48**
- Figura 3: Avaliação do comprometimento e da recuperação imune em pacientes com leishmaniose visceral (LV) ao longo do acompanhamento clínico. Contagens absolutas de linfócitos T CD4+ (A) e T CD8+ (C) por mm³ em pacientes com LV. Ganho de linfócitos T CD4+ (B) e T CD8+ (D) em relação à fase ativa da doença em pacientes com LV. Cada ponto colorido se refere ao mesmo paciente ao longo das fases do acompanhamento. FA – fase ativa, pós tto – pós-tratamento, 6mpt e 12 mpt – seis e 12 meses pós-tratamento. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo * $p < 0,05$51**
- Figura 4: Correlação negativa entre as contagens de linfócitos T CD4+ e o número de episódios totais de leishmaniose visceral. Cada ponto colorido se refere a um paciente dos grupos não-recidivantes (NR) ou recidivantes (R) na fase ativa da doença. Correlação de Spearman, Graph Pad Prism, 6.0.52**
- Figura 5: Avaliação prospectiva da resposta de linfócitos B por meio da quantificação de IgG, IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania infantum* em pacientes com LV. Níveis séricos de IgG (A), IgG1 (B) e IgG3 (C) em pacientes com leishmaniose visceral não-recidivantes e recidivantes durante acompanhamento clínico: fase ativa (FA), após o tratamento (Pós tto), seis meses após o tratamento (6mpt) e doze meses após o tratamento (12mpt). Cada ponto colorido se refere ao mesmo paciente ao longo das fases do acompanhamento e as barras horizontais se referem à mediana dos valores. * $p < 0,05$55**

Figura 6: Associações identificadas entre contagens de linfócitos T CD4+ e níveis de imunoglobulinas anti-*Leishmania infantum*, bem como com correlação com o número de episódios de recidivas. Correlação positiva entre os níveis de IgG1 anti-*Leishmania* dos pacientes com leishmaniose visceral não-recidivantes e recidivantes na fase ativa com os níveis de IgG total anti-*Leishmania* (A) e globulina (B), respectivamente. Correlação entre os níveis de IgG3 anti-*Leishmania* e as contagens de linfócitos T CD4+ (C) e o número de episódios totais de recidivas da LV (D), respectivamente. Cada ponto colorido se refere a um paciente do grupo dos pacientes não-recidivantes (NR) ou recidivantes (R) em cada fase do acompanhamento. Correlação de Spearman, Graph Pad Prism, 6.0.56

Figura 7: Avaliação prospectiva dos níveis de IL-6 em pacientes com leishmaniose visceral. Níveis plasmáticos de IL-6 em pacientes com leishmaniose visceral não-recidivantes e recidivantes ao longo do acompanhamento clínico: fase ativa FA, após o tratamento (Pós tto) e seis meses após o tratamento (6mpt). Cada ponto colorido se refere ao mesmo paciente ao longo das fases do acompanhamento e as barras horizontais se referem à mediana dos valores. * p<0,05.57

Figura 8: Correlação entre os níveis plasmáticos de IL-6 em pacientes com leishmaniose visceral não-recidivantes e recidivantes na fase ativa e após o tratamento (Pós tto) com as contagens de leucócitos totais (A), linfócitos totais (B), níveis de albumina (C) e níveis de proteína C reativa – PCR (D). Cada ponto colorido corresponde a um paciente ao longo das fases do acompanhamento58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características laboratoriais dos pacientes com leishmaniose visceral durante a fase ativa da doença.....46

Tabela 2: Características laboratoriais dos pacientes com leishmaniose visceral após o tratamento.....47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Aids	Do Inglês, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AnfoB	Anfotericina B
CTLA-4	Do Inglês, Proteína associada ao linfócito T citotóxico 4
EDTA	Do Inglês ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Do Inglês, Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HIV	Do Inglês, Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	Do Inglês, Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LAG-3	Do Inglês, gene 3 de ativação de linfócitos
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
MIF	Do Inglês, fator de inibição da migração de macrófagos
PBS	Do Inglês, Tampão fosfato-salino
PCR	Do Inglês, Reação em cadeia da polimerase
PD-1	Do Inglês, proteína de morte celular programada 1
TNF- α	Do Inglês, Fator de Necrose Tumoral alfa
TRL4	Do Inglês, receptor do tipo Toll 4

INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia da leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* e é transmitida para mamíferos através da picada da fêmea de flebótomos. Já foram descritas mais de 10 espécies envolvidas na transmissão e, no Brasil, a principal é *Lutzomyia longipalpis* (Ministério da Saúde 2017), que é popularmente conhecido como mosquito palha, asa-dura, tatuquiras ou birigui.

A leishmaniose é endêmica em mais de 90 países ou territórios, contudo, em 2017, sete países concentraram mais de 90% dos casos – Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Sudão do Sul e Sudão (WHO 2018). Em nível mundial, vem sendo observada uma redução de sua incidência global na última década: em 2012 foram 200.000-400.000 novos casos (Alvar et al 2012), enquanto em 2017 os casos diagnosticados ficaram entre 50.000-90.000 (WHO 2018).

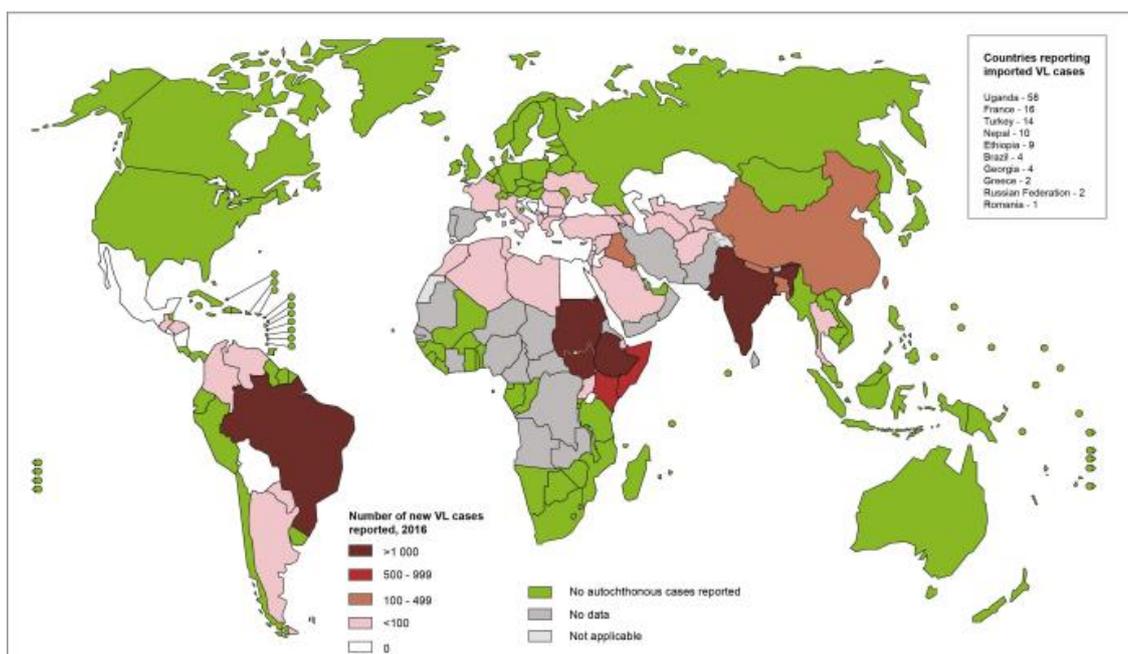


Figura 1: Mapa mundial da endemicidade da leishmaniose visceral, 2016. Adaptado de WHO 2018.

No continente americano, por sua vez, em 2018, foram diagnosticados 3562 novos casos de LV e o Brasil foi responsável por 97% dos mesmos. É notável também a presença da doença em pacientes infectados pelo HIV, sendo que dos 250 casos de coinfeção diagnosticados nas Américas em 2018, 246 ocorreram em território brasileiro (OPAS/OMS 2019). Sendo assim, a doença é um grande problema de saúde pública no Brasil, principalmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. Em 2017, foram registrados 4103 novos casos de LV, com 327 óbitos no Brasil (Ministério da Saúde 2018). Há predomínio da LV em pacientes do sexo masculino e em crianças menores de 10 anos.

Em termos gerais, a LV é mais comum em áreas rurais, contudo, é possível observar uma tendência à urbanização da doença nos últimos anos em território brasileiro (Romero & Boelaert 2010). O primeiro relato de epidemia urbana descrito no país foi em Teresina, capital do Piauí, entre os anos de 1981-1984 (Costa et al 1990). Desde esse mesmo período também foram descritos casos no estado do Rio de Janeiro e em 2013 há o relato do primeiro paciente na área urbana da cidade do Rio de Janeiro (Souza et al 1981; Silva et al 2014). Grande parte nas últimas décadas dos casos vem sendo relatada em grandes centros como Belo Horizonte, Campo Grande, Natal, Ceará, Tocantins, e desde 1999 é relatado em São Paulo e Mato Grosso (Jeronimo et al 1994, Profeta da Luz et al 2001, Camargo-Neves et al 2003, Oliveira et al 2006). Em 2016, foram evidenciados os primeiros casos autóctones em grande centro do sul do país, na cidade de Porto Alegre (Mahmud et al 2019). Já Belo Horizonte é uma das cidades do Brasil com o maior número de casos registrados, onde foram confirmados 1767 casos da doença de 1994 até abril de 2019 (Prefeitura de Belo Horizonte, 2019).

1.2. Ciclo de vida do parasito *Leishmania (Leishmania) infantum*

As fêmeas dos flebotomíneos são hematófagas e são infectadas ao ingerirem células com amastigotas durante os repastos. No intestino do vetor, os amastigotas se diferenciam em promastigotas, alcançando posteriormente a probóscide. Em seguida, a partir de picada em humanos, essas formas

infectantes (promastigotas metacíclicas) são injetadas e fagocitadas por macrófagos e outras células do sistema fagocítico. No interior dessas células, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, forma evolutiva capaz de se multiplicar e infectar mais células levando ao desenvolvimento da doença (CDC 2019).

A infecção também ocorre em reservatório animal, comumente cães em ambientes peridomiciliares ou raposas e morcegos em áreas silvestres, ou em humanos. A transmissão zoonótica é mais comumente associada a *Leishmania (Leishmania) infantum* e ocorre em regiões como China, Oriente Médio, Mediterrâneo e América do Sul. Já na Índia, Bangladesh e leste da África a espécie implicada é normalmente *L. donovani*, podendo também ser transmitida em um ciclo antroponótico (van Griensven & Diro 2012, Roque & Jansen 2014). Condições epidemiológicas para a transmissão da doença em regiões urbanizadas foram criadas no Brasil nas últimas décadas, a partir de migração intensa para os grandes centros. Dessa forma, o cenário envolve concentração populacional associada à presença de reservatórios animais (notadamente o cão doméstico) e do vetor no mesmo ambiente (Diniz et al 2008).

No Brasil, o cão parece ser o principal reservatório do parasito. Não se sabe com precisão a prevalência de animais infectados, porém, estudos em diferentes regiões revelam números alarmantes: em uma área endêmica de LV em Belo Horizonte a prevalência de cães positivos para *L. infantum* diagnosticados pela técnica de PCR foi de quase 25% (Coura-Vital et al 2011). Outro dado de extrema relevância é a existência de grande número de cães que não desenvolvem sintomas, aparentando estar saudáveis, porém mantendo-se como possível reservatório do parasito (Baneth et al 2008). Por outro lado, existe a possibilidade de outros mamíferos servirem como reservatório, como felinos e marsupiais – como gatos domésticos e gambás, respectivamente. Esse fator pode ser uma das muitas justificativas para o mau desempenho do programa brasileiro de eliminação de cães infectados (Roque & Jansen 2014).

Na região Amazônica, um estudo realizado no Maranhão evidenciou soropositividade para *L. infantum* em 32% dos 105 gatos analisados. Apesar

dos felinos não serem comprovadamente um reservatório do parasito em termos de transmissão da doença para o homem, dados adquiridos a partir desses animais em áreas endêmicas podem ter função de sinalizar a circulação de *L. infantum* (Rocha et al 2019). Sendo assim, a leishmaniose felina vem sendo vista como uma doença emergente (Pennisi & Persichetti 2018) e o diagnóstico de animais sintomáticos também pode funcionar como sentinela.

1.3. Apresentação clínica, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral

Sabe-se que fatores como características intrínsecas do parasito, biologia do vetor e fatores do hospedeiro são os principais determinantes no processo de infecção e doença, de modo que a combinação desses fatores resultará em diferentes apresentações clínicas, que podem variar desde pacientes assintomáticos até doença visceral grave (Colmenares et al 2012). De forma geral, a LV é considerada uma doença grave e pode ser fatal quando não tratada. Em áreas endêmicas, entretanto, algumas pessoas não desenvolvem a doença e cursam com infecção assintomática. Recentemente, foi identificada infecção assintomática em 19,5% dos 200 soldados americanos avaliados após missões no Iraque (Mody et al 2019). Casos assintomáticos também foram descritos na Índia (Singh et al 2014), Bangladesh (Bern et al 2007), Espanha (Moral et al 2002) e Brasil (Badaró et al 1986). Dados referentes a Natal – Rio Grande do Norte, revelaram soropositividade para anticorpos anti-*Leishmania* em 24,6% dos 345 indivíduos assintomáticos testados (Lima et al 2012). Em um trabalho realizado em três regiões de Belo Horizonte foi encontrada soroprevalência para *L. infantum* entre 24 a 29% em crianças que não apresentavam sintomas associados à LV (Dos Santos Marques et al 2017). O mais provável nesse contexto é que não ocorra eliminação completa do parasito e, no caso de alguma imunodepressão futura, o indivíduo estará sujeito a manifestar a doença (Alvar et al 2008).

Quando há manifestação clínica da doença, comumente há comprometimento de órgãos e tecidos como fígado, baço, medula óssea e

linfonodos a partir da infecção do sistema fagocítico mononuclear. A apresentação clínica classicamente compreende febre persistente associada a perda de peso, astenia, adinamia, hepatoesplenomegalia e adenomegalia que se instalam de maneira insidiosa e podem persistir por meses (Costa et al 2010).

Laboratorialmente, é verificada pancitopenia, o que em muitos casos graves leva à necessidade de transfusão de hemocomponentes, associada ao aumento de moléculas de caráter inflamatório, como proteína C reativa e aumento da velocidade de hemossedimentação. Além disso, há elevação de gamaglobulinas em detrimento da albumina, que frequentemente se encontra diminuída nesses pacientes (Costa et al 2016, Van Griensven J & Diro 2019). Alterações da função renal também já foram descritas e um estudo brasileiro mostrou que cerca de 15% das crianças de uma coorte (n=146) acompanhadas em um hospital de Fortaleza – Ceará apresentaram insuficiência (n=21) ou falência renal (n=1) (Libório et al 2012).

A desnutrição é marcante nesses pacientes e um estudo desenvolvido na Etiópia mostrou que 82% dos doentes se encontravam abaixo do peso (Feleke 2019). A esplenomegalia é proeminente e pode complicar devido a infartos ou sangramentos subcapsulares espontâneos (Van Griensven & Diro 2012). A disfunção hepática é descrita, podendo haver aumento de transaminases, icterícia e ascite com a progressão da doença. Devido à hypoalbuminemia, à inflamação, ao aumento da permeabilidade vascular, pode ocorrer edema, e o alto grau de consumo metabólico ao qual esses pacientes são submetidos leva à caquexia.

Com a evolução da LV, o paciente pode apresentar sangramentos espontâneos e desenvolver infecções bacterianas secundárias, o que pode desencadear quadros de sepse (Van Griensven & Diro 2012). As intercorrências infecciosas de origem bacteriana são bastante comuns, conforme observado em coorte brasileira de 30 crianças em Salvador – Bahia, das quais, 18 (60%) desenvolveram infecções bacterianas durante internação para o tratamento de leishmaniose visceral (Andrade et al 1990). Além disso, complicações inflamatórias graves, como linfocitose hemofagocítica, podem ocorrer. Essa complicação esteve presente em cerca de 35% dos

pacientes acompanhados em uma coorte espanhola (Horrillo et al 2019). Conforme observado por Daher, o fenômeno não é raro no Brasil, onde das 127 crianças internadas por LV em hospital terciário da região Nordeste, 35 foram diagnosticadas com linfocitose hemofagocítica (Daher et al 2015)

Alguns fatores de risco para mau prognóstico são descritos, como extremos de idade, desnutrição, diarreia, vômito, anemia grave, trombocitopenia com grande aumento de baço e icterícia, mas as principais causas de morte são infecções bacterianas subjacentes e sangramentos (Werneck et al 2003, Collin et al 2004, Costa et al 2010). Estudo de caso-controlado com pacientes brasileiros no Piauí definiu como sinais e sintomas associados a desfecho fatal: diarreia, vômito, edema, icterícia, esplenomegalia e plaquetopenia, quando presentes da admissão hospitalar até 48 horas após a internação (Oliveira-Sena & Werneck 2019).

Nesse sentido, foi desenvolvido um escore de risco de morte baseado no acompanhamento de uma coorte de pacientes em Teresina – Piauí. Foram criados sistemas de pontuações diferentes para crianças menores de dois anos e para os demais indivíduos, além de dois modelos: um que leva em conta apenas dados clínicos e outro que adiciona dados laboratoriais. Os dados clínicos analisados são idade (dividida em três categorias: 2-20 anos, 20-40 anos e maiores de 40 anos), número de sítios de sangramento, edema, icterícia, dispneia, infecção bacteriana e Aids. Contagem de leucócitos menor que 1500 células/mm³, plaquetopenia inferior a 50.000 células/mm³ e exames compatíveis com insuficiência renal são as variáveis laboratoriais. Cada uma dessas variáveis tem uma pontuação de forma que a pontuação máxima no escore clínico é de 11 e no clínico-laboratorial, de 20. O estudo definiu que pacientes com maior risco de óbito são aqueles que na avaliação inicial apresentam pontuação maior ou igual a 4 no escore clínico e maior ou igual a 6 no escore clínico-laboratorial (Ministério da Saúde 2017). De maneira a facilitar a aplicação dessas ferramentas, foi desenvolvido um software, denominado Kala-Cal®, disponível publicamente na Internet, que permite o cálculo do escore online (Costa et al 2016).

A suspeição diagnóstica deve ocorrer em todo indivíduo proveniente de área endêmica que apresente febre e esplenomegalia ou em indivíduo

sintomático, mesmo sem história epidemiológica associada, cujos diagnósticos diferenciais já tenham sido excluídos. Os exames inespecíficos revelando pancitopenia e inversão da relação albumina/globulina podem auxiliar na investigação (Ministério da Saúde 2017).

O diagnóstico etiológico pode ser realizado a partir de exames imunológicos (imunofluorescência indireta, testes rápidos imunocromatográficos e ensaio imunoenzimático – ELISA), parasitológicos e moleculares (a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase). A observação direta do parasito nos tecidos é o padrão ouro de diagnóstico. O material biológico pode ser proveniente da medula óssea, linfonodos ou baço, sendo preferível utilização do primeiro, essencialmente pela segurança do procedimento. O aspirado esplênico não é amplamente empregado, dada a sua alta taxa de complicações.

Em relação aos exames imunológicos, é necessária cautela em sua avaliação, uma vez que, após contato com o patógeno e tratamento adequado, os títulos de anticorpos podem permanecer persistentemente elevados. Entretanto, pela sua praticidade, vem substituindo a necessidade de coleta de medula óssea e exame parasitológico em determinados locais com infraestrutura precária no diagnóstico inicial, não sendo bom indicador de cura ou reativação da doença.

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, a decisão de tratamento ambulatorial ou hospitalar depende das condições clínicas do paciente e de fatores de risco para pior evolução da doença. Seguindo o escore de gravidade desenvolvido pelo grupo do Piauí (Costa et al 2016), o paciente é classificado de acordo com sua gravidade e, levando em consideração também a presença ou não de comorbidades, a conduta terapêutica é traçada.

O antimoniato de N-metil glucamina é formalmente indicado como primeira escolha, com a vantagem de poder ser realizado em regime ambulatorial (Ministério da Saúde 2017). A dose recomendada é de 20mg/Sb⁵⁺/kg/dia por via intravenosa ou intramuscular por 20 a 40 dias. Entretanto, há relatos de falhas de tratamento com esse fármaco por resistência, envolvendo a superfamília de transportadores ABC (Ouellette et al

1998, Manzano et al 2013) e já foram identificados mecanismos de resistência envolvendo um elevado metabolismo de tiol (Magalhães et al 2018).

A AnfoB é um medicamento muito eficiente no tratamento da LV. Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, esse fármaco deve ser empregado como primeira escolha em um grupo seletivo de pacientes: pacientes classificados com risco elevado de morte pelo escore de gravidade, extremos de idade (menores de um ano e maiores de 50 anos), gestantes, indivíduos infectados por HIV, falhas terapêuticas com outras medicações, contraindicação ao uso de antimonial pentavalente, imunodeficientes (de causas primárias ou secundárias) e outras comorbidades (como insuficiências hepática, renal e cardíaca). A formulação indicada é a lipossomal e a dose recomendada é de 3mg/kg/dia por sete dias ou 4mg/kg/dia por cinco dias. Nos casos em que a AnfoB lipossomal está indicada, porém não está disponível, ou naqueles pacientes com contraindicação ao uso de antimonial pentavalente sem critérios clínicos que justifiquem o uso de AnfoB lipossomal, a abordagem terapêutica indicada é o uso de Desoxicolato de AnfoB (dose: 1mg/kg/dia por 14 a 20 dias) – droga de menor custo, mas que, por sua vez, apresenta mais efeitos colaterais (Ministério da Saúde 2017). Outra formulação de AnfoB que tem sido utilizada é a AnfoB complexo lipídico. Esta formulação apresenta um perfil de efeitos adversos menos tóxico que a desoxicolato de AnfoB, à semelhança da AnfoB lipossomal – também formulação lipídica (Falci et al 2015). Em um estudo avaliando pacientes que não apresentaram melhora ou recidivaram após tratamento com antimonial pentavalente, os mesmos foram tratados com doses diferentes de AnfoB complexo lipídico e verificou-se que 90 e 100% dos pacientes responderam com dose acumulada de 10 e 15mg/kg desse fármaco (Sundar et al 1997).

Em um ensaio clínico multicêntrico, aberto, randomizado desenvolvido no Brasil comparando quatro esquemas terapêuticos (1- desoxicolato de AnfoB 1mg/kg/dia por 14 dias; 2- AnfoB lipossomal 3mg/kg/dia por 7 dias; 3- combinação de AnfoB lipossomal em dose única de 10mg/kg/dia associada a antimoniato de N-metil glucamina 20mg Sb⁵⁺/kg/dia por 10 dias e 4- antimoniato de N-metil glucamina 20mg Sb⁵⁺/kg/dia por 20 dias), foi evidenciado que o tratamento de maior eficácia, menor toxicidade e menor

tempo de administração é monoterapia com a AnfoB lipossomal. Diante disso, é sugerido que essa seja a droga de escolha como primeira linha no Brasil (Romero et al 2017). Segundo a Sociedade Americana de Medicina Tropical, a AnfoB lipossomal deve ser a medicação de escolha para o tratamento da LV, em dose acumulada de 21mg/kg. Ressalta-se, ainda, que doses acumuladas superiores, de 40mg/kg, podem ser necessárias em algumas regiões do mundo, como o leste africano (Aronson et al 2016). Vale ressaltar que, no Brasil, poucos fármacos estão disponíveis para o tratamento da doença, havendo aumento da resistência a esses medicamentos de forma crescente. Além disso, efeitos adversos pronunciados envolvendo disfunções renal, pancreática, hepática e cardíaca estão descritos com o tratamento (Lindoso & Lindoso 2009).

A taxa de sucesso do tratamento das infecções varia substancialmente de acordo com a região avaliada e com a dose empregada. Observa-se uma eficácia clínica que varia entre 35-95% com o uso do antimonial pentavalente na dose habitual diária em um regime de 28 a 30 dias (Van Griensven, J & Diro 2019). A AnfoB desoxicolato no regime de 0,75-1mg/kg/dia por 15-20 doses mostra uma eficácia clínica superior a 97% nas diversas regiões analisadas enquanto a AnfoB lipossomal com dosagem total entre 10-30mg/kg revela eficácia em mais de 95% dos casos na Europa e Ásia, enquanto no Brasil e leste africano é verificada eficácia menor (Van Griensven, J & Diro 2019).

1.4. Imunopatogênese da leishmaniose visceral

A interação entre o patógeno e o sistema imune do hospedeiro determina a apresentação clínica, gravidade e risco de morte, possibilidade de cura clínica ou ocorrência de recidiva (Rodrigues da Silva 1957, Rossi et al 2017). Apesar da desregulação imune da resposta específica associada à infecção ser um mecanismo chave na fisiopatogenia da infecção por *L. infantum*, conhecimentos mais recentes têm mostrado que a LV ativa se apresenta, de fato, como um quadro inflamatório exuberante, semelhante ao que é visto na sepse, dengue grave e malária grave, por exemplo, com elevado grau de

ativação celular e altos níveis de citocinas (Bozza et al 2008, Andrade et al 2010, Costa et al 2010, Costa et al 2013).

A infecção por *Leishmania spp.* ocorre em células do sistema fagocítico mononuclear e, com a apresentação de seus antígenos por células apresentadoras, há ativação de células T CD4⁺ e produção de IL-12. A produção desta citocina leva à transcrição de genes que permitem a diferenciação do perfil de resposta Th1 e à montagem de uma ação específica efetiva contra o agente, com função protetora conhecida (Rosas et al 2006, Phillips et al 2010). Assim, é formado o eixo de resposta via IL-12 e IFN-gama e sua ausência pode determinar a geração de citocinas Th2 (Khadem et al 2014).

Idealmente, esse tipo de resposta levaria ao controle da infecção e evitaria a progressão para a doença. Entretanto, o que se observa nos pacientes em fase ativa da LV é uma resposta celular deficiente, caracterizada por uma imunossupressão ou mais apropriadamente imunoparalisia. Um exemplo relevante é a negatividade do Teste de Montenegro, importante avaliador de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania*, que se apresenta negativo nesses pacientes (Goto & Prianti 2009).

Além disso, foi descrita ainda a incapacidade de produção de IL-2 e IFN- γ por linfócitos T de indivíduos doentes frente aos estímulos parasitários. Considerando que o IFN- γ é importante para a atividade leishmanicida de macrófagos e a IL-2 é fundamental para diversas funções dos linfócitos, como proliferação e maturação, a ausência desses dois fatores impede uma resposta efetiva ao patógeno (Carvalho *et al* 1985). Em adição, alteração na geração de novas células com blastogênese linfocitária reduzida também já foi descrita na LV (Carvalho et al 1983).

Um estudo europeu com infecções por *L. infantum* demonstrou, por sua vez, que a maior parte dos pacientes com LV analisados durante atividade de doença não demonstravam imunidade mediada por células específica anti-*Leishmania*. Após o tratamento da doença, houve um aumento significativo de IFN- γ e proliferação de células mononucleares no sangue periférico, demonstrando um retorno da capacidade desse tipo de resposta nessa forma

da doença, mas não em outras formas de leishmaniose como a tegumentar, mucosa e linfadenopatia localizada (Botana et al 2018).

Diante desse panorama, em vigência de LV ativa, há concomitante anergia da resposta celular efetora e presença de resposta de perfil Th2, inclusive com elevações séricas de citocinas características como IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13, e também de TNF- α . As citocinas de perfil Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, possuem propriedade de reduzir o estresse oxidativo nos macrófagos infectados, o que reduz a eliminação do parasito (Maran et al 2016). Recentemente, o papel dessas citocinas na progressão da doença tem sido reavaliado e existe o questionamento sobre a sua função. A IL-4, por exemplo, é capaz tanto de ativar uma resposta humoral que favorece a doença como de promover a secreção de IFN- γ por células T CD8⁺ em infecções por *L. donovani* (Dayakar et al 2019).

Um trabalho recente comparando camundongos suscetíveis e resistentes à infecção por *L. infantum* mostrou que, no modelo resistente, houve aumento de células T CD4⁺ polifuncionais, enquanto nos animais suscetíveis houve aumento de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-10, os linfócitos T reguladores (Treg) (Pérez-Cabezas et al 2019). A IL-10 tem caráter regulador, com atividade imunossupressora e antiinflamatória, durante a fase ativa da infecção, perpetuando a doença ao desativar células efetoras importantes como os macrófagos (Schaut et al 2016). A presença de IL-10 em diversos tecidos de pacientes infectados já foi associada a maior gravidade da doença (Nylen et al 2007). É provável, portanto, que a presença desta citocina impeça o organismo de gerar uma resposta ideal contra o parasito, sendo uma peça fundamental na suscetibilidade ao microorganismo e desencadeamento da infecção (dos Santos et al 2016). Inclusive, um estudo brasileiro avaliou vinte pacientes com LV ativa e a partir de acompanhamento prospectivo dos mesmos, observou que os indivíduos doentes apresentavam queda dos níveis de IL-10 após o tratamento efetivo da doença e controle do parasito (Caldas et al 2005), corroborando essas informações.

Os linfócitos T CD4⁺ com perfil Th17 também estão envolvidos na LV e desempenham papéis diferentes na imunopatogenia da doença (Jaweda et al 2019). Ocorre a geração de diversas citocinas durante o processo infeccioso,

dentre elas a IL-23, fundamental no processo de diferenciação do tipo Th17 a partir de células T CD4⁺ *naive*. Já foi demonstrado que em camundongos com deficiência do receptor de IL-17 do tipo A há maior suscetibilidade ao *L. infantum*. (Nascimento et al 2015). Na LV, portanto, os linfócitos Th17 têm função protetora e alguns trabalhos mostram que isso ocorre a partir da secreção de citocinas inflamatórias como IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF, IL-6, IL-26 (Harrington et al 2005) e recrutamento de neutrófilos para o local (Gonçalves-de-Albuquerque et al 2017). A balança entre a geração de células Th17 e Treg ocorre de acordo com a presença de certas citocinas e vai variar entre função protetora preponderante e suscetibilidade à infecção. Em concordância com tais achados, é provável que os determinantes de resistência e suscetibilidade à infecção e à doença em humanos também sejam fortemente influenciados pelo tipo de resposta celular predominante em cada indivíduo (Jaweda et al 2019).

A IL-6 é a principal citocina associada à doença letal, mas IFN- γ , TNF, IL1- β , IL-8 e IL-27 também estão envolvidos na geração de um quadro de maior gravidade (Costa et al 2013, dos Santos et al 2016). Em um paciente com LV ativa, é possível, portanto, observar tanto citocinas ativadoras de macrófagos e atuantes no controle da infecção, quanto citocinas com propriedades inibitórias e capazes de perpetuar o processo de dano tissular.

Em um estudo com hamsters infectados por *L. donovani*, observou-se que os linfócitos TCD4⁺ esplênicos desses animais expressavam RNAm de citocinas e quimiocinas tanto do tipo Th1 quanto Th2, além da expressão em grande quantidade de receptores e ligantes inibitórios de forma concomitante (Medina-Colorado et al 2017). Em concordância com os modelos experimentais, foi demonstrado que em seres humanos com LV ativa também há produção elevada de citocinas Th2, como IL-10, IL-4 e TNF e também de IL-6, IL-8, IL-12 e IFN- γ (Peruhype-Magalhães et al 2006, Costa et al 2012). Esse fenômeno de produção exagerada configura um processo conhecido como tempestade de citocinas e faz parte do intenso processo inflamatório descrito na LV (Costa et al 2010).

De forma bastante interessante, estudo brasileiro identificou, a partir da comparação entre pacientes com infecção ativa de LV e indivíduos com

infecção assintomática, que esses últimos apresentavam maior concentração de IL-2 (Costa et al 2012). Tal informação é compatível com o fato desta citocina ser importante para a resposta de linfócitos T e, conseqüentemente, para o controle da infecção (Carvalho et al 1985).

Em relação aos linfócitos T CD8⁺, não está claro se a citotoxicidade mediada por essa célula apresenta valor protetor no contexto da LV ativa. Existem estudos mostrando que a ativação de macrófagos infectados a partir dessas células via IFN- γ leva ao controle do crescimento parasitário (Tsagozis et al 2003, Polley et al 2006 e Tsagozis et al 2005). Estudos utilizando infecção por *L. donovani* mostraram ainda que a liberação de IFN- γ , perforina e granzimas por esses linfócitos podem prevenir o estabelecimento do parasito e da infecção (Majumder et al 2012). Todavia, um estudo brasileiro utilizando células humanas T CD8⁺ *naive* de indivíduos saudáveis evidenciou que após contato inicial com *L. infantum*, os linfócitos T CD8⁺ promoveram aumento de IFN- γ e IL-10 em conjunto à expressão elevada de CTLA-4 – molécula sabidamente de caráter inibitório. Esses fatos podem justificar a resposta celular efetiva deficiente e eliminação do parasito prejudicada, observada em muitos pacientes (Viana et al 2019).

Na LV ativa há hipergamaglobulinemia não específica, decorrente de ativação policlonal de células B, com presença inclusive de autoanticorpos. Uma pequena quantidade de anticorpos específicos é produzida, principalmente no início do quadro, todavia, o papel dos mesmos na LV ativa é controverso. Alguns trabalhos mostram, por exemplo, que a fagocitose de amastigotas opsonizadas por IgG pelos macrófagos leva à secreção de IL-10 e inibe a produção de IL-12 (Miles et al 2005, Thomas et al 2008 e Buxbaum et al 2008). Outro exemplo é o fato de imunocomplexos possivelmente estarem envolvidos na complexa patogênese da glomerulonefrite na LV, associada também à migração de células T CD4⁺ e outros mecanismos (Costa et al 2003; Costa et al 2010b). Por outro lado, há relato na literatura de papel protetor das imunoglobulinas em tecidos, como fígado (Smelt et al 2000), assim como é descrita a formação de anticorpos contra fatores de virulência de *Leishmania*, reduzindo os danos causados pelo agente infeccioso (Shreffler et al 1993).

Em estudo com primatas não humanos, foi visto que o aumento de imunoglobulinas ocorre na fase inicial da infecção, o que persiste na fase crônica, correlacionando-se positivamente com a gravidade da doença. Nesse mesmo estudo, foi verificada uma expansão de células B de memória CD27⁺ e elevação dos níveis de imunoglobulinas anti-*Leishmania*. Essas têm seus níveis reduzidos ao longo da evolução clínica da infecção concomitantemente com a diminuição dos linfócitos T CD4⁺ foliculares do baço. A incapacidade em manter esse último tipo celular e seu estímulo para produção de anticorpos pode ser uma das justificativas para a falha em sustentar uma resposta humoral adequada à infecção durante a LV (Rodrigues et al 2014, Rodrigues et al 2016) .

Outro fator que pode contribuir para o status ativado e inflamatório da LV ativa inclui a possibilidade de alteração da permeabilidade da parede intestinal decorrente da capacidade de o parasita infectar células do trato gastrointestinal (Rodrigues da Silva 1957, Luz et al 2010). Isso permitiria a translocação bacteriana, incluindo as bactérias Gram negativas, que são ricas em lipopolissacarídeo (LPS), um potente ativador do sistema imunológico, conforme descrito na infecção pelo HIV (Brenchley et al. 2006). Assim, nosso grupo já verificou que pacientes com LV ativa apresentam níveis elevados de LPS no plasma, e correlação negativa destes com as contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Ao mesmo tempo, tal produto também se correlacionou positivamente com a ativação de células T, e com citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8 e MIF (Santos-Oliveira et al 2011).

Posteriormente, foi sugerido que a presença de níveis elevados de CD14 solúvel (sCD14) presentes na LV ativa pode ser outro mecanismo pelo qual citocinas inflamatórias (IL-6, IL-27 e IL-10) podem ser geradas e liberadas. Esta glicoproteína está presente na membrana de monócitos e macrófagos e funciona como co-receptor associado ao TLR4 nos linfócitos, facilitando o reconhecimento de LPS e possivelmente poderia ser ativada pela *Leishmania spp.*, funcionando como perpetuador da infecção (dos Santos et al 2016).

Diante disso, é fundamental atentar para outros fatores adjuvantes na geração de inflamação durante a infecção pela LV e o quanto eles podem estar

envolvidos na evolução clínica dos pacientes, contribuindo para os diferentes desfechos clínicos observados nos mesmos.

Com a progressão da infecção para a fase crônica e a manutenção de um estado continuamente ativado do sistema, ocorre comprometimento importante da função de células T. Esse fenômeno é conhecido como exaustão ou senescência (Wherry 2011). Inicialmente, ocorre redução da citotoxicidade e da produção de IL-2 e, portanto, da capacidade linfoproliferativa da célula. De forma progressiva, há perda da capacidade de degranulação e redução da produção de TNF e IFN- γ (Wherry et al 2011, Schietinger et al 2014 e Joshi et al 2009). O processo também é caracterizado pela expressão sustentada de receptores conhecidamente inibitórios dos linfócitos T efetores, como PD-1, CTLA-4 e LAG-3. Foi identificado primeiramente em infecções virais crônicas, notadamente na infecção pelo HIV, porém, em infecções por protozoários o mesmo mecanismo pode ser percebido (Jin et al 2010, Gigley et al 2012 e Wherry et al 2015). Apesar de melhor descrito para células T CD8⁺, um processo semelhante de envelhecimento, perda de função e morte também ocorre com células T CD4⁺, tendo sido observado durante a LV, levando ao prejuízo na resposta ao patógeno (Esch et al 2013). Dessa forma, o estado de ativação imune persistente na LV levando à senescência de células T parece estar envolvido na progressão para casos mais graves da doença ou mesmo nas recidivas (Gautam et al 2014, Maran et al 2016). Recentemente, Silva-Freitas e colaboradores (2016) mostraram uma correlação positiva entre o número de recidivas e o grau de ativação celular em pacientes coinfetados LV/HIV. Os autores sugeriram que possivelmente as recidivas da doença estão associadas a uma ativação celular que, apesar de cada vez mais intensa, seja persistentemente ineficiente em manter o paciente em remissão clínica.

Por fim, é importante destacar que a intensa ativação do sistema imune observada na LV que contribui para o grau de senescência das células também pode contribuir para uma diminuição das contagens de células T CD4⁺ totais na periferia. Isso indica que investigar se essa população de linfócitos T está sendo renovada pelos órgãos linfoides primários de forma diferenciada pelos pacientes com LV com diferentes desfechos clínicos é crucial para o

entendimento da evolução clínica da doença, em termos de manutenção de remissão clínica ou recidivas da LV.

Há, na literatura, várias tentativas de identificação de marcadores imunológicos prognósticos na LV, e algumas moléculas já foram apontadas como possíveis soluções para essa questão: a leptina (Fievez et al 2019); a molécula de CD14 solúvel (sCD14) (Santos-Oliveira et al 2011, dos Santos et al 2016); citocinas como IL-6, IL-8, TNF, IL-1 β (Costa et al 2013) e subclasses de imunoglobulinas específicas anti-*Leishmania* (Ansari et al 2008, Fievez et al 2019). A avaliação das diferenças entre os níveis de imunoglobulinas, principalmente a IgG e suas subclasses, durante a infecção, assim como no pós-tratamento imediato e tardiamente, é fundamental para o conhecimento sobre a resposta humoral à LV e parecem promissores marcadores de recidivas (Bhattacharyya et al 2014).

Há, na fase inicial da doença ativa, produção de IgM específica, seguida de IgG, que se mantém positiva mesmo após o término da infecção e cura clínica. No que se refere às subclasses de IgG, sabe-se que a IgG1 e IgG3 são produzidas diante de antígenos proteicos enquanto IgG2 e IgG4 são formados em resposta a antígenos de origem polissacarídica (Schroeder et al 2010). Na LV ativa, há produção principalmente de IgG1 e também de IgG3, sendo os níveis de IgG2 e IgG4 baixos (Caldas et al 2005).

De forma interessante, apesar dos níveis de IgG total anti-*Leishmania* se manterem elevadas por longos períodos, algumas de suas subclasses se comportam de maneira diferente. Em uma população da Índia, foi visto que durante a infecção ativa há aumento de IgG1 e que seis meses após o tratamento, em pacientes considerados curados, os níveis desse anticorpo ficaram abaixo do valor de corte para soropositividade pelo método ELISA. No mesmo estudo, a IgG3 se comportou de maneira semelhante apesar de na fase da doença ativa não ter se mantido consistentemente elevada (Bhattacharyya et al 2014). Em um trabalho de nosso grupo, pacientes brasileiros apresentaram tanto IgG1 quanto IgG3 elevadas na fase ativa da LV, com redução significativa após o tratamento. A IgG3 apresentou redução mais importante após um mês de tratamento, alcançando valores semelhantes aos de indivíduos saudáveis (Fievez et al 2019). Além disso, tem sido demonstrado

que a maioria dos pacientes que apresentava recidiva clínica tinha títulos de IgG1 detectáveis, o que não foi observado nos pacientes considerados curados e, por esse motivo, testes rápidos para análise de IgG1 vêm sendo estudados para permitir diagnóstico precoce de recidivas em países como a Índia (Bhattacharyya et al 2014, Marlais et al 2018).

Neste cenário, as subclasses de IgG vêm sendo consideradas importantes biomarcadores para o acompanhamento de cura clínica ou recidivas nos pacientes com LV. Tal fato já foi descrito inclusive em pacientes diagnosticados com LV que são coinfetados por HIV, nos quais os níveis de IgG3 reduzem ao longo do seguimento em pacientes que mantêm remissão clínica, sem recidivas (Bhattacharyya et al 2004 e Silva-Freitas et al 2016).

1.6. Recidivas na leishmaniose visceral

As recidivas são definidas pelo ressurgimento de sinais e sintomas após o tratamento adequado. Na LV, a cura é definida pelo desaparecimento de febre, citopenia e esplenomegalia, após seis meses de seguimento. Um episódio de recidiva deve ser suspeitado em caso de ressurgimento de febre, piora de citopenia ou aumento da esplenomegalia em relação ao alcançado ao fim do tratamento medicamentoso (Cota et al 2017).

É notável que pacientes coinfetados com HIV apresentam maior número de recidivas (Simão et al 2020), com descrições de diversos fatores de maior risco para o surgimento de novos episódios da doença nesse grupo. Em uma coorte etíope, foi visto que em dois anos de acompanhamento 35% dos pacientes recidivaram a LV. Neste estudo, o uso da terapia antirretroviral foi um fator associado a um menor risco, enquanto altos níveis de parasito circulante foram descritos como de risco mais elevado para episódios de recidiva (Abongomera et al 2017). Já foi verificado também que em pacientes coinfetados, a contagem de células T CD4⁺ era significativamente menor nos pacientes recidivantes em comparação aos não recidivantes após um ano de seguimento, sugerindo um papel central da resposta celular na prevenção de recidivas (Silva-Freitas et al 2016, Cota et al 2017).

Na Índia, alguns dados clínicos como sexo masculino, extremos de idade e pouca diminuição da esplenomegalia foram considerados fatores de risco para recidivas em pacientes imunocompetentes (Burza et al 2014). Uma revisão sistemática com meta-análise etíope avaliou o desfecho após o tratamento da LV entre 2001 e 2017 e mostrou que após o término de tratamento o sucesso terapêutico era de aproximadamente 83%. Entretanto, após seis meses, houve redução para cerca de 72% de sucesso, sugerindo que esses pacientes devem ser acompanhados por alguns meses para avaliação de recidivas, mesmo depois de considerados clinicamente curados (Gebreyohannes et al 2018). Uma coorte espanhola mostrou taxa de recidiva de 12% e o fenômeno foi associado de forma significativa à ausência de profilaxia adequada em pacientes coinfetados com HIV e a doses inferiores a 21mg/kg de AnfoB lipossomal dentre os pacientes sem HIV (Horrillo et al 2019). Em Babar, Sudão, o seguimento de pacientes durante uma epidemia mostrou recidiva em 5,7% dos pacientes. Os casos de recidivas se concentravam em três famílias e as recidivas não pareciam se relacionar com infecção por outras cepas de *Leishmania*, assim como não estavam relacionadas à coinfeção LV/HIV. Não foram identificadas diferenças no perfil de resistência do parasito desses pacientes em relação aos demais, que não apresentaram recidiva. Um estudo genético dessas famílias permitiu a identificação de duas mutações – uma em heterozigose e outra em homozigose – no gene da monooxigenase alquilglicerol como provável causa das recidivas. Um estudo brasileiro desenvolvido em São Luís no Maranhão mostrou 2,3% de recidivas em crianças diagnosticadas com LV entre 2006 e 2011. Todas as crianças que recidivaram foram tratadas com antimoniato de meglumina, sendo que a maior parte tinha idade entre 3 a 6 anos e 50% era do sexo masculino (Caldas et al 2013). A partir de dados secundários do SINAN, uma análise dos casos de LV no Brasil entre 2001 e 2010 mostrou que as recidivas ocorriam em 3,1% dos pacientes não coinfetados por HIV (Gomes 2012).

A despeito desse percentual significativo de recidivas de LV identificado em pacientes não coinfetados por HIV no Brasil e no mundo, em protocolos clínicos oficiais brasileiros não há informação de como reconhecer os pacientes

mais sujeitos a recidivas, assim como o manejo terapêutico dos mesmos não é bem definido (Prestes-Carneiro et al 2019).

Ademais, há estudos visando a identificação de marcadores de recidivas da LV em pacientes coinfectedados pelo HIV-1, grupo sabidamente mais suscetível à recrudescência da doença (Silva-Freitas et al 2016). Existem, ainda, diversos estudos associando possíveis marcadores clínicos, laboratoriais e imunológicos na LV voltados sobretudo para predição de casos de gravidade e risco de morte (Werneck et al 2003, Caldas et al 2013, Costa et al 2012, 2016, dos Santos et al 2016, Fievez et al 2019), enquanto que em relação às recidivas, poucos estudos relacionam esses desfechos com marcadores, clínicos ou laboratoriais, nos pacientes não coinfectedados por HIV. Resultados encontrados no Sudão durante os anos de 1999 e 2007 observaram aumento das recidivas no período (Gorski et al 2010). Na Geórgia, em coorte de LV na faixa etária pediátrica, foi verificada a associação de recidivas com idades inferiores a um ano e diagnóstico tardio (Kajaia et al 2011). Estudo brasileiro mostrou que além da infecção por HIV, plaquetopenia, edema de membros inferiores e pneumonia secundária foram associados de forma independente com recidiva (Simão et al 2020).

Diante de dados iniciais e pouco concordantes, mais estudos com foco em recidiva são necessários para determinar possíveis fatores associados que permitam identificação precoce desses pacientes. Nessa perspectiva, o presente trabalho pretende avaliar pacientes recidivantes e não recidivantes quanto a características clínico-laboratoriais e imunológicas com o intuito de observar e descrever as possíveis diferenças entre esses dois grupos.

2. JUSTIFICATIVA

A LV é endêmica no Brasil, com cerca de 4.000 novos casos notificados no ano de 2017 (Ministério da Saúde 2018). A doença vem apresentando uma mudança no seu perfil epidemiológico e passou a ocorrer também em áreas urbanas, mantendo morbimortalidade significativa. Além disso, ocorre associação com a infecção por HIV, o que também justifica grande preocupação em relação a essa doença.

Em relação aos mecanismos imunopatogênicos, sabe-se que a LV é causa de prejuízo a órgãos essenciais do sistema imune e proporciona elevado grau de imunossupressão específica aos antígenos parasitários ao lado de um intenso grau de inflamação. O curso clínico pode ser insidioso, todavia, é grave e pode levar o paciente a óbito caso o tratamento adequado não seja implementado de forma precoce. Ainda quando o tratamento é eficiente, uma parcela dos pacientes evolui com gravidade clínica extrema e outra apresenta recidiva(s) da doença.

A LV cursa com diversas alterações no sistema imunológico, como a redução de linfócitos T CD4⁺, ativação policlonal de linfócitos B, aumento de LPS plasmático, com provável origem do lúmen intestinal e elevados níveis de citocinas inflamatórias (tempestade de citocinas). Contudo, o papel dessas modificações nas diferentes evoluções clínicas em termos de recidivas da doença ainda não foi definido, principalmente em indivíduos imunocompetentes. Apesar de haver estudos relacionando dados clínicos, laboratoriais e imunológicos ao risco de morte e gravidade da doença, pouco está sistematizado na literatura com relação a fatores de risco associados a recidivas.

Nesse sentido, com a importância que as recidivas assumem no manejo da LV, é importante identificar se há diferenças nos parâmetros clínicos e imunológicos, que possam estar associadas aos diferentes desfechos clínicos nos pacientes com LV, procurando observar padrões de resposta ao patógeno e mecanismos que possam ser relacionados à cura definitiva e a recidivas clínicas da doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar parâmetros clínico-laboratoriais e imunológicos associados aos diferentes desfechos clínicos de pacientes com leishmaniose visceral no intuito de observar fatores de risco relacionados à chance de recidiva.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar se há diferenças no perfil clínico, hematológico e bioquímico observados antes e após o tratamento leishmanicida que tenham potencial de discriminar pacientes que evoluíram com recidiva ou cura clínica da LV;
- Investigar o grau de comprometimento e de recuperação imune dos pacientes com LV através das contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, no sentido de verificar se existe prejuízo na resposta imune efetora e se esta pode estar associada à reativação ou ao controle da leishmaniose visceral;
- Avaliar os níveis de imunoglobulinas anti-*Leishmania* da classe IgG e suas subclasses ao longo do acompanhamento clínico dos pacientes com LV, no intuito de verificar se podem ser considerados parâmetros preditores de cura ou recidiva após tratamento da LV;
- Avaliar os níveis de IL-6, citocina envolvida no processo inflamatório na LV, para entender se o aumento da indução desta citocina se correlaciona às recidivas.

4. METODOLOGIA

4.1. Casuística

O estudo é uma série de casos, em que foram acompanhados quinze pacientes com LV ativa diagnosticados no Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, Minas Gerais. O recrutamento dos pacientes para esse estudo começou em maio de 2018 e foi finalizado em setembro de 2019, contudo, o recrutamento de pacientes com LV para outros estudos de nosso grupo segue em andamento. O diagnóstico de LV foi confirmado pela pesquisa direta de amastigotas em aspirado de medula óssea associada à clínica com sinais e sintomas sugestivos de LV, como febre, perda ponderal e esplenomegalia. Os pacientes incluídos nesse estudo obedecem aos seguintes critérios: são indivíduos maiores de 18 anos de ambos os sexos, não gestantes e são pacientes com diagnóstico de leishmaniose visceral, sem HIV-1, acompanhados no mesmo hospital.

Os pacientes foram separados em dois grupos distintos, conforme a evolução clínica da LV. Os pacientes NR, não-recidivantes (n=10) foram aqueles que apresentaram um único episódio ativo de LV ao longo do acompanhamento clínico. Já os pacientes R, recidivantes (n=5) foram aqueles que apresentaram mais de um episódio ativo de LV, seja história prévia de recidiva à admissão no estudo ou mesmo durante o seguimento.

A cura clínica foi definida pelo desaparecimento de febre, citopenia e esplenomegalia e recidiva foi confirmada por isolamento do parasito em medula óssea (exame direto ou cultura em meio NNN) ou diagnosticada por critérios clínicos, definidos por Cota et al em 2017: ressurgimento de febre, piora de citopenia ou aumento da esplenomegalia em relação ao alcançado ao fim do tratamento medicamentoso.

Os pacientes e os voluntários sadios que aceitaram participar deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A), regido de acordo com as normas da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, MS. Este projeto está vinculado ao protocolo "Avaliação prospectiva de parâmetros imunológicos aplicáveis ao monitoramento do curso

clínico de pacientes coinfectados com leishmaniose visceral e HIV-1” que já foi aprovado pelo CEP/IOC-Fiocruz (CAAE: 68118117.3.1001.5248). Além disso, também foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto René Rachou- Fiocruz, Minas Gerais (CAAE: 68118117.3.3001.5091), pelo Hospital Eduardo de Menezes (FHEMIG) (CAAE: 68118117.3.3002.5124) e pelo Hospital São José de Doenças Infecciosas, Fortaleza, Ceará (Anexo B).

Os indivíduos foram acompanhados de modo prospectivo em um total de pelo menos seis meses de seguimento, desde a fase ativa da doença, totalizando três visitas principais: fase ativa (até 48h do início do tratamento leishmanicida), logo após o tratamento anti-*Leishmania*, e seis meses pós-tratamento. Alguns participantes foram seguidos até doze meses pós-tratamento.

A coleta de dados clínicos e laboratoriais foi realizada a partir da revisão dos prontuários, analisando evoluções médicas e exames complementares.

Como grupo controle, foram incluídos dez indivíduos saudáveis, dentre eles seis de área endêmica (provenientes de Belo Horizonte – MG) e quatro de área não endêmica (provenientes dos bairros Tijuca, Vila Isabel e Maracanã no Rio de Janeiro – RJ).

Na fase ativa da doença, foram coletadas informações referentes a sinais e sintomas relacionados a LV, como febre, astenia, hiporexia, emagrecimento, vômito, diarreia, sangramento, palidez, edema, esplenomegalia, hepatomegalia, icterícia e infecção bacteriana subjacente. Além disso, dados laboratoriais, como hemograma, função hepática e função renal também foram coletados em dois momentos: fase ativa e imediatamente após o tratamento.

Não houve participação por parte da equipe de pesquisa na decisão sobre a terapia empregada no tratamento da LV. Dessa forma, as decisões terapêuticas foram guiadas pela equipe assistencial do HEM.

4.2. Obtenção de material biológico para ensaios laboratoriais

Os participantes foram convidados a participar do estudo na fase ativa da LV. Nesse momento foram coletados 40mL de sangue periférico de cada

indivíduo divididos em 3 tubos com heparina (10 mL cada) e 2 tubos com EDTA (5 mL cada). O procedimento foi repetido nos seguintes momentos posteriores: logo após o final do tratamento, seis meses e doze meses após o término do tratamento ou a qualquer momento em que houvesse mudança no curso clínico da infecção, isto é, quando ocorressem reativações da doença.

O plasma com heparina foi aliquoteado e estocado a -70°C para ser utilizado em ensaios laboratoriais posteriores. O sangue conservado em EDTA foi utilizado para a contagem absoluta dos linfócitos $\text{TCD4}^+/\text{TCD8}^+$ e uma alíquota foi estocada para posterior quantificação da parasitemia. A quantificação das contagens de linfócitos T CD4^+ foi realizada no serviço de referência do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz.

No plasma com heparina foram avaliados os perfis de citocinas e os níveis de imunoglobulinas IgG anti-*Leishmania* e suas subclasses IgG1 e IgG3.

4.3. Quantificação das contagens absolutas de linfócitos T CD4^+ e T CD8^+

As contagens absolutas de linfócitos T CD4^+ e T CD8^+ foram realizadas a partir de 50 μL de sangue total, utilizando-se o sistema de tubos com *beads* ou bilhas de referência BD TruCount® (Becton-Dickinson – BD Franklin Lakes, NJ, EUA), e um painel de anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de CD45^+ , CD3^+ , CD4^+ e CD8^+ , marcados com peridina-clorofila (PercP), fluoresceína (FITC), alofococianina (APC) e ficoeritrina (PE), respectivamente (BD Multitest®, BD Biosciences). As amostras foram avaliadas por citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento FACSCalibur® (BD Biosciences) e um software apropriado para esta análise (Multiset®, BD Biosciences). Os resultados foram expressos em número de células por milímetro cúbico (células/ mm^3). A quantificação das contagens de linfócitos T CD4^+ foi realizada no serviço de referência do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz.

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

Os níveis de IgG anti-*Leishmania* e suas subclasses foram dosados a partir de ensaio imunoenzimático (ELISA) conforme previamente descrito por Fagundes-Silva e colaboradores (2012). Em suma, antígenos solúveis de promastigotas de *L.(L.) infantum* (MHOMBR/1974/PP75), em uma concentração de 40 µg/mL, foram utilizados para realização do *coating* ou cobertura da microplaca de poliestireno de fundo plano (Nunc Immuno Plate, Roskilde, Denmark), e incubados a 4°C em câmara úmida de modo *overnight* pelo período de 20 horas. Após lavagens seguidas pelo bloqueio da placa com o tampão contendo PBS + 0,05% de Tween 20 e 10% de soro fetal bovino (SFB), o plasma diluído (1:10.000 para IgG, 1:2.000 para IgG1 e 1:200 para IgG3) dos pacientes LV foi adicionado à placa e estas foram submetidas à incubação em temperatura ambiente. Após seis lavagens, anticorpos monoclonais anti-IgG (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA), anti-IgG1 e anti-IgG3 humanas (ZymedLaboratories Inc., San Francisco, CA, EUA), conjugados à peroxidase, foram adicionados nas diluições de 1:1.000, 1:500 e 1:400, respectivamente, e a placa contendo o complexo antígeno – amostra – anticorpo foi novamente incubada à temperatura ambiente. Depois de novas lavagens, a reação enzimática foi revelada com OPD (ortofenilenodiamino) e água oxigenada a 30% e uma solução de ácido clorídrico 2N foi utilizada para interromper a reação. A absorbância foi detectada através do equipamento Microplatereader Benchmark (Bio-RadLaboratories, Hercules, CA, EUA) a 492 nm e os resultados foram expressos como índice de ELISA (IE), o qual se baseia na divisão da média da densidade ótica (DO) das duplicatas das amostras dos pacientes, pela média da DO obtida dos controles negativos.

4.5. Dosagem de citocinas

Os níveis de IL-6 foram quantificados nas amostras de plasma estocados a -70°C através de um kit comercial (IL-6 Quantikine ELISA, R&D

Systems, Minneapolis, Maryland, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Uma curva padrão de sete pontos diluídas em reagente de calibração, assim como as amostras foram quantificadas em duplicata. A cor desenvolvida em cada poço foi proporcional à quantidade de IL-6 presente em cada amostra. A densidade óptica foi determinada pelo equipamento Microplate reader Benchmark (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a 450nm. Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL), e o limite mínimo de detecção foi 3,13 pg/mL.

4.6. Análise estatística

Os resultados dos parâmetros laboratoriais analisados foram expressos em medianas e com seus intervalos interquartis, demonstrados entre colchetes.

O cálculo do ganho de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi realizado a partir da proporção entre o número de células presentes no momento analisado e o número de células presentes na fase ativa da doença.

As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism (version 6.0, San Diego, CA, USA). As comparações entre os dois grupos de pacientes LV recidivantes e não-recidivantes ou mesmo de cada um desses grupos com os indivíduos sadios foram realizadas pelo teste não-pareado e não-paramétrico, MannWhitney t-test. Quando os mesmos indivíduos foram comparados nas diferentes fases do acompanhamento utilizou-se o teste pareado e não-paramétrico Wilcoxon t-test. Quando três ou mais grupos foram comparados simultaneamente, foi utilizado o teste ANOVA (Kruskal-Wallis test) e o pós-teste de Dunns. Foram consideradas diferenças significativas aquelas com valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com leishmaniose visceral

O estudo contempla 15 pacientes que foram divididos em dois grupos: não recidivantes (NR, n=10) e recidivantes (R, n=5). No grupo R foram incluídos os pacientes com história pregressa de recidiva, sendo que um deles iniciou o estudo em sua primoinfecção e apresentou recidiva ao longo do acompanhamento. Em relação ao número de recidivas, um paciente tem história de cinco episódios de LV, dois pacientes têm passado de três episódios e os demais apresentaram um episódio de recidiva. Por outro lado, os pacientes NR, por definição, apresentaram apenas um episódio da doença (Tabela 1).

Três pacientes são do sexo feminino, dois do grupo NR e um do grupo R, sendo os demais do sexo masculino (oito do grupo NR e quatro do grupo R). A mediana de idade foi de 38 anos [30,8-46,5] anos e 44 anos [20-61] anos em NR e R, respectivamente. Em relação aos sinais e sintomas da doença, cerca de 90% dos pacientes relataram febre (n=14). Esse dado foi ausente apenas em um paciente do grupo R, cuja única queixa foi perda ponderal. Em anamnese inicial, 11 pacientes referiram astenia e 13 relatavam emagrecimento associado ao quadro. A esplenomegalia foi verificada em todos os pacientes a partir de exame físico e/ou de exames de imagem, e 12 pacientes apresentaram aumento concomitante do tamanho do fígado. Apenas três pacientes se queixaram de dor abdominal e nenhum deles tinha icterícia ou relato de diarreia à admissão hospitalar. Dois pacientes relataram sangramentos prévios à internação e um apresentou hematêmese durante a evolução clínica.

As comorbidades descritas pelos pacientes foram: obesidade, diabetes, hipertensão arterial, dislipidemia, insuficiência cardíaca chagásica, epilepsia, hanseníase virchowiana, doença psiquiátrica sem especificação, hipotireoidismo, subclínico, colelitíase, passado de esquistossomose, tabagismo e ex-tabagismo, etilismo e ex-etilismo, além de uso regular atual ou

passado de drogas ilícitas. Um paciente não possuía relato sobre comorbidades, dois relatavam apenas etilismo social.

Em relação ao tratamento da LV, apenas um paciente completou o tratamento em uso de desoxicolato de AnfoB. Quatro pacientes iniciaram o tratamento com esse fármaco, porém, foi necessário substituí-lo pela apresentação lipossomal devido a efeitos colaterais, principalmente de origem renal. Todos esses pacientes eram do grupo NR. Três pacientes fizeram uso apenas de AnfoB lipossomal (dois do grupo NR) e seis de AnfoB complexo lipídico, sendo quatro do grupo R. Um paciente NR iniciou o tratamento com Glucantime®, sendo o mesmo suspenso por efeito adverso hepático e substituído por AnfoB lipossomal. As dosagens inicialmente prescritas respeitavam as orientações do Ministério da Saúde; entretanto, devido a diversas particularidades clínicas como recidivas, presença de comorbidades e efeitos colaterais houve variações do uso dos medicamentos.

Durante a evolução clínica, oito pacientes receberam antibioticoterapia por apresentarem febre associada à neutropenia, sem foco definido. Ademais, dois pacientes foram admitidos no hospital após tratamento de infecção bacteriana, um deles com relato de infecção do trato urinário e outro de sinusite. Três pacientes apresentaram suspeita de infecção bacteriana e também foram tratados com antibiótico, sendo um abscesso dentário e os outros dois, por foco urinário.

Conforme apresentado na tabela 1, os parâmetros laboratoriais referentes à função renal, como a dosagem sérica de ureia e creatinina, se encontravam normais na maioria dos pacientes antes do uso de AnfoB e não revelaram diferenças entre pacientes NR e R. Já em relação ao comprometimento hepático, por sua vez, a dosagem de AST se comportou de forma diferente entre os grupos, sendo significativamente mais elevada em pacientes do grupo NR (69,5 U/L, [56,8-195,8 U/L]) do que no R (38 U/L [24-79 U/L]) ($p < 0,05$). Embora a bilirrubina total estivesse nos níveis de normalidade em ambos os grupos, os níveis da bilirrubina direta estavam mais tendencialmente mais elevados nos NR (0,65 mg/dL [0,4-0,8 mg/dL]) em relação aos R (0,3 mg/dL [0,3-0,5 mg/dL]) ($p = 0,06$).

Os níveis de proteínas totais se mantiveram dentro dos limites de normalidade no grupo NR (7,2 g/dL [6,7-8,3 g/dL]), mas estavam acima do limite máximo nos R (8,9 g/dL [7,2-9,2 g/dL]). Ao analisarmos as frações, verificou-se uma elevação de globulina (NR=5,5 g/dL [4,3-6,4 g/dL]; R=5,8 g/dL [4,2-6,0 g/dL]) em detrimento da albumina. Esta última, por sua vez, estava bastante reduzida em ambos os grupos (NR=2,5 g/dL [2,2-2,7 g/dL] e R=3,1 g/dL [2,6-3,2 g/dL]), porém, de forma mais proeminente em pacientes NR ($p=0.06$).

Os pacientes, independentemente de serem NR ou R, apresentaram alto grau de atividade inflamatória que pode ser inferido a partir da elevação da proteína C reativa (NR= 72 mg/dL [42,3-154,5 mg/dL] e R= 54,5 mg/dL [39,5-174,5 mg/dL]), em comparação aos parâmetros de normalidade (<10 mg/dL), sem diferença estatística entre os grupos de pacientes (Tabela 1).

Na fase ativa da doença, todos os pacientes apresentaram anemia, sendo a mediana de hemoglobina de 7,0 g/dL [6,1-9,8 g/dL] em pacientes do grupo NR e 8,9 g/dL [6,8-9,3 g/dL] naqueles do grupo R (Tabela 1). Apesar de não ser significativa, foi verificada além de baixa contagem de leucócitos totais em todos os pacientes, uma diferença entre os dois grupos, sendo que nos pacientes NR a leucopenia foi mais pronunciada do que nos pacientes R, com valor de mediana de 1.300 cél/mm³ [975-1.775 cél/mm³] e 1.700 cél/mm³ [1.100-2.200 cél/mm³], respectivamente. Todos os pacientes apresentavam neutropenia e quatro foram considerados neutropênicos graves na admissão hospitalar (contagens menores que 500 cél/mm³), sendo três do grupo NR. Observou-se linfopenia em todos os pacientes, sendo que nos pacientes NR a mediana também foi menor em relação aos pacientes R (NR= 547,5 cél/mm³ [493,8-789 cél/mm³]; R= 748 cél/mm³ [425,5-925 cél/mm³]), embora sem diferença estatística (Tabela 1). Foram observados valores de monócitos dentro da normalidade em cerca de 80% dos pacientes. Em relação à dosagem de plaquetas, a mediana do grupo NR foi 68.000 cél/mm³ [42,8-80,8 cél/mm³], enquanto do grupo R foi 107.000 cél/mm³ [88-216,5 cél/mm³] ($p<0,05$).

Em relação ao pós tratamento imediato não foi possível obtermos esse tipo de avaliação, posto que muitos dados laboratoriais não foram obtidos por se tratar de uma decisão tomada pela equipe assistencial de acordo com a

evolução clínica do paciente. Dessa maneira, apesar da maior parte dos indivíduos apresentarem hemograma nessa fase, muitos deles não tinham dosagem de bilirrubina total e frações, proteínas totais e frações e proteína C reativa, por exemplo, o que dificultou a comparação entre as duas fases em relação a esses parâmetros.

É possível observar, em relação aos índices hematimétricos, que a anemia é menos pronunciada em pacientes NR (mediana= 8,3 g/dL [7,7-8,8 g/dL]) em relação aos do grupo R (mediana=7,56 g/dL [7,1-7,8 g/dL]), diferentemente da fase ativa, em que os pacientes NR apresentavam anemia mais grave do que os pacientes R (Tabela 2).

Os leucócitos totais e linfócitos se comportaram de forma similar, de modo que na fase imediatamente após o tratamento o quantitativo dessas células foi maior nos pacientes NR em relação aos pacientes R, embora sem diferença significativa (Tabela 2). Comparando os pacientes NR nesses dois momentos distintos, podemos observar uma elevação estatisticamente significativa, de modo que os leucócitos totais aumentaram de 1.300 cél/mm³ [975-1.775 cél/mm³] para 2.950 cél/mm³ [1.825-3.675 cél/mm³], neutrófilos de 598 cél/mm³ [434-838 cél/mm³] para 1.100 cél/mm³ [853-1.616 cél/mm³] e linfócitos de 548 cél/mm³ [494-789 cél/mm³] para 1.224 cél/mm³ [690-1.736 cél/mm³] ($p < 0,05$). O mesmo não foi observado no grupo R, no qual, apesar do aumento de leucócitos (de 1.700 cél/mm³ [1.100-2.200 cél/mm³] para 2.500 cél/mm³ [1.275-4.100 cél/mm³]), neutrófilos (de 858 cél/mm³ [447-1.141 cél/mm³] para 1.605 cél/mm³ [818-2.933 cél/mm³]) e linfócitos (de 748 cél/mm³ [426-925 cél/mm³] para 810 cél/mm³ [300-899 cél/mm³]), não foi possível observar significância estatística.

Em relação às plaquetas, o grupo NR apresentou um aumento na fase imediatamente após tratamento, com mediana de 133 x10³ cél/mm³ [64,3-254,5 x10³ cél/mm³]. A diferença foi significativa em relação à fase ativa, cuja mediana foi de 68 x10³ cél/mm³ [42,8-80,8 x10³ cél/mm³]. Já em pacientes R de forma geral, foi verificado um decréscimo discreto na contagem das plaquetas, cuja mediana passou de 107 x10³ cél/mm³ [88-216 x10³ cél/mm³] na fase ativa, para 97 x 10³ cél/mm³ [47-140 x10³ cél/mm³] no pós-tratamento (Figura 2). Ao analisarmos caso a caso, esse parâmetro não parece ser importante. Dos dez

pacientes NR, cinco apresentaram aumento, sendo que, desses, um ainda manteve valores abaixo da referência de normalidade. Dentre os quatro pacientes R avaliados no pós-tto, um tinha níveis normais e os valores foram mantidos, dois mantiveram níveis plaquetários baixos e o outro apresentou elevação na contagem de plaquetas.

Nos pacientes NR, a ureia passou de 32,3 mg/dL [28-36,7 mg/dL] para 46,3 mg/dL [24,4-58,9 mg/dL] ($p < 0,05$); e creatinina de 0,85 mg/dL [0,6-1,2 mg/dL] para 1,25 mg/dL [0,9-1,65 mg/dL] ($p < 0,05$). Nos pacientes R, ocorreu um aumento menos pronunciado, com níveis de ureia de 25,5 mg/dL [19,3-42,7 mg/dL] e creatinina de 0,9 mg/dL [0,5-1,5 mg/dL] na fase ativa e imediatamente após o tratamento passaram a apresentar níveis de ureia de 32,1 mg/dL [25,9-56 mg/dL] e creatinina 1,1 mg/dL [0,8-1,55 mg/dL]. Na comparação entre as duas fases há uma tendência de piora relativa da função renal após o tratamento se comparada à fase ativa. É evidente um aumento de ureia e creatinina, embora a maior parte dos valores, mesmo após o tratamento, permaneça dentro dos níveis considerados normais. Esse fato provavelmente é decorrente de efeitos colaterais associados ao uso de AnfoB.

Tabela 1: Características laboratoriais dos pacientes com leishmaniose visceral durante a fase ativa da doença

	Identificação do paciente	Sexo	Idade	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (cél./mm ³)	Eosinófilos (cél./mm ³)	Basófilos (cél./mm ³)	Neutrófilos (cél./mm ³)	Linfócitos (cél./mm ³)	Monócitos (cél./mm ³)	Plaquetas (x10 ³ cél./mm ³)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Bilirrubina Total (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Bilirrubina Indireta (mg/dL)	Proteínas totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulina (g/dL)	PCR (mg/dL)
VR				13,5-17,5	41-53	4000-11000	0-500	0-200	1600-7000	920-5000	80-1000	150-450	F: 15-36 M: 19-43	F: 0,52-1,04 M: 0,66-1,25	F: 14-36 M: 17-59	M: 9-52 H: 21-72	0,2-1,3	0,0-0,4	0,0-1,1	6,3-8,2	3,5-5,0	1,4-3,2	<10
Não-Recidivantes	LV01	M	27	10,5	30,9	1700	0	0	765	816	119	92	31,2	0,9	295	187	0,77	0,32	0,44	9	2,5	6,5	31
	LV02	M	18	9,3	29	3300	0	0	1419	1683	198	73	32,8	0,8	294	137	0,3	0,3	0	7,1	2,7	4,4	46
	LV03	M	48	6,9	20,4	1300	13	0	637	546	104	77	49,4	1,2	50	49	0,9	0,7	0,2	6,8	2,6	4,2	56
	LV04	M	32	9,6	28,8	2000	40	0	1040	780	160	51	33,4	0,7	70	67	0,9	0,8	0,1	5,8	2,3	-	130
	LV05	M	44	6,1	19,9	1000	0	0	540	360	100	134	23,1	0,9	59	34	0,6	0,4	0,2	7,8	2,4	5,4	62
	LV08	M	45	11,1	34	1300	0	0	559	663	78	18	29,6	0,6	118	57	0,7	0,5	0,2	6,7	-	-	262
	LV11	M	61	7,1	22,8	900	27	9	252	549	63	11	35,3	1,2	69	30	0,9	0,7	0,2	8,1	2	6,1	86
	LV12	F	32	6	18,2	1100	0	0	495	495	110	66	31,8	0,3	44	26	1,2	0,8	0,4	7,4	1,9	5,5	228
	LV13	F	32	6,6	21,1	1400	14	0	770	490	126	70	14,5	0,5	163	71	0,9	0,6	0,3	6,7	3	3,7	82
	LV14	M	46	4,7	14,1	900	27	9	162	540	162	60	41	1,3	68	18	1,3	1,1	0,2	9,3	2,5	6,8	31
Mediana (IQR)	NA	38 (30,8-46,5)	7 (6,1-9,8)	21,95 (19,5-29,5)	1300 (975-1775)	6,5 (0-27)	0 (0-2,3)	598 (434,3-837,5)	547,5 (493,8-789)	114,5 (94,5-160,5)	68 (42,8-80,8)	32,3 (28-36,7)	0,85 (0,6-1,2)	69,5 (56,8-195,8)	53 (29-87,5)	0,9 (0,7-1)	0,65 (0,4-0,8)	0,2 (0,2-0,3)	7,25 (6,7-8,3)	2,5 (2,2-2,7)	5,5 (4,3-6,4)	72 (42,3-154,5)	
Recidivantes	LV06	M	17	9,1	28,2	2200	44	0	858	1100	198	119	28	1,1	20	22	0,5	0,3	0,2	9,2	3,2	6	47
	LV07	M	23	9,5	29,5	1700	17	0	918	578	187	107	25,5	0,9	28	29	0,8	0,3	0,5	7,2	3	4,2	212
	LV09	M	61	7,3	23,8	700	0	0	294	273	133	94	57,3	1,8	38	22	0,5	0,2	0,3	8,9	3,1	5,8	37
	LV10	M	61	8	25,1	1500	15	0	600	750	135	82	15,6	0,5	101	82	0,7	0,5	0,2	-	-	-	62
	LV15	F	44	6,3	20,6	2200	22	0	1364	748	66	314	22,9	0,4	57	36	0,4	0,4	0	-	2,4	-	-
	Mediana (IQR)	NA	44 (20-61)	8 (6,8-9,3)	25,1 (22,3-28,9)	1700 (1100-2200)	17 (7,5-33)	0 (0-0)	858 (447-1141)	748 (425,5-925)	135 (99,5-192,5)	107 (88-216,5)	25,5 (19,3-42,7)	0,9 (0,5-1,5)	38 (24-79)	29 (22-59)	0,5 (0,5-0,8)	0,3 (0,3-0,5)	0,2 (0,1-0,4)	8,9 (7,2-9,2)	3,05 (2,6-3,2)	5,8 (4,2-6)	54,5 (39,5-174,5)
Valor de p	NA	0,98	0,76	0,59	0,39	0,31	0,52	0,44	0,67	0,32	0,01	0,29	0,98	0,03	0,30	0,03	0,06	0,77	0,27	0,06	0,96	0,76	

VR: Valores de referência; IQR: Intervalo Interquartil; M: Masculino; F: Feminino; AST: Aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; PCR: Proteína C reativa; NA: não se aplica

Tabela 2: Características laboratoriais dos pacientes com leishmaniose visceral após o tratamento.

	Identificação do paciente	Sexo	Idade	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (cél/mm ³)	Eosinófilos (cél/mm ³)	Basófilos (cél/mm ³)	Neutrófilos (cél/mm ³)	Linfócitos (cél/mm ³)	Monócitos (cél/mm ³)	Plaquetas (x10 ³ cél/mm ³)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Bilirrubina Total (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Bilirrubina Indireta (mg/dL)	Proteínas totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulina (g/dL)	PCR (mg/dL)		
VR				13,5-17,5	41-53	4000-11000	0-500	0-200	1600-7000	920-5000	80-1000	150-450	F: 15-36 M: 19-43	F: 0,52-1,04 M: 0,66-1,25	F: 14-36 M: 17-59	M: 9-52 H: 21-72	0,2-1,3	0,0-0,4	0,0-1,1	6,3-8,2	3,5-5,0	1,4-3,2	<10		
Não-Recidivantes	LV01	M	27	8,4	25,3	3000	150	0	1100	1560	180	159	40,4	1,4	261	274	0,6	0,6	0				5		
	LV02	M	18	8,1	25,6	6200	61	0	3100	2356	682	322	66,6	1,1	36	93	0,1	0,1	0						
	LV03	M	48	7,8	22,9	2000	40	0	1100	660	200	131	51,1	1,6	29	38	0,4	0,4	0		3,5				
	LV04	M	32	8,9	26,5	3900	195	0	1482	1911	312	243	37,8	1							2,4		6		
	LV05	M	44	8,6	26,8	1900	38	0	855	931	114	135	32,3	1	29	35									
	LV08	M	45	8,8	27,7	1600	0	0	800	720	80	15	56,3	1,4	88	50	0,9	0,7	0,2						
	LV11	M	61	7,3	24	1600	64	0	848	656	32	20	67,7	2										66	
	LV12	F	32	10,3	29,1	3000	30	0	1380	1410	180	79	22,8	0,5	137	68	0,4	0,4	0						
	LV13	F	32	8,2	20,0	2900				1090			289	45	0,7			0,7							
	LV14	M	46	6,3	20,2	3600	144	0	2016	1224	216	80	47,6	1,8	67	18	2,1	0,5	1,6					137	
	Mediana (IQR)	NA	38 (30,8-46,5)	8,3 (7,67-8,82)	25,45 (22,23-27,03)	2950 (1825-3675)	61 (34-147)	0 (0,0-0,0)	1100 (853,3-1616)	1224 (690-1736)	180 (97-264)	133 (64,25-254,5)	46,3 (24,43-58,88)	1,25 (0,92-1,65)	67 (29-137)	50 (35-93)	0,6 (0,4-0,9)	0,45 (0,32-0,62)	0,0 (0,9-0,55)		2,95 (2,4-3,5)		36 (5,25-119,3)		
	Recidivantes	LV06	M	17										47,8	1,5										
		LV07	M	23	7,7	23,9	2100	21	0	1470			101	30,6	1,1	25	37	0,6	0,4	0,2					
		LV09	M	61	7,8	25,2	1000	40	0	600	300	60	93	64,2	1,6										
LV10		M	61	7	22,6	4500	135	0	3330	810	225	153	32,1	1			0,4	0,3							
LV15		F	44	7,4	23,2	2900	116	0	1740	899	145	317	21,1	0,6	44	25								9	
Mediana (IQR)		NA	44 (20-61)	7,55 (7,1-7,77)	23,55 (22,75-24,88)	2500 (1275-4100)	78 (25,75-130,3)	0,0 (0,0-0,0)	1605 (817,5-2933)	810 (300-899)	145 (60-225)	97 (47,02-140)	32,1 (25,85-56)	1,1 (0,8-1,55)	34,5 (25-44)	31 (25-37)	0,5 (0,4-0,6)	0,35 (0,3-0,4)	0,2 (0,2-0,2)				9 (9-9)		
Valor dep	NA	0,98	0,08	0,28	0,76	0,85	>0,99	0,52	0,18	0,70	0,58	0,29	0,84	0,30	0,22	0,75	0,46	-	-	-	-	-	-		

VR: Valores de referência; IQR: Intervalo Interquartil; M: Masculino; F: Feminino; AST: Aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; PCR: Proteína C reativa; NA: não se aplica

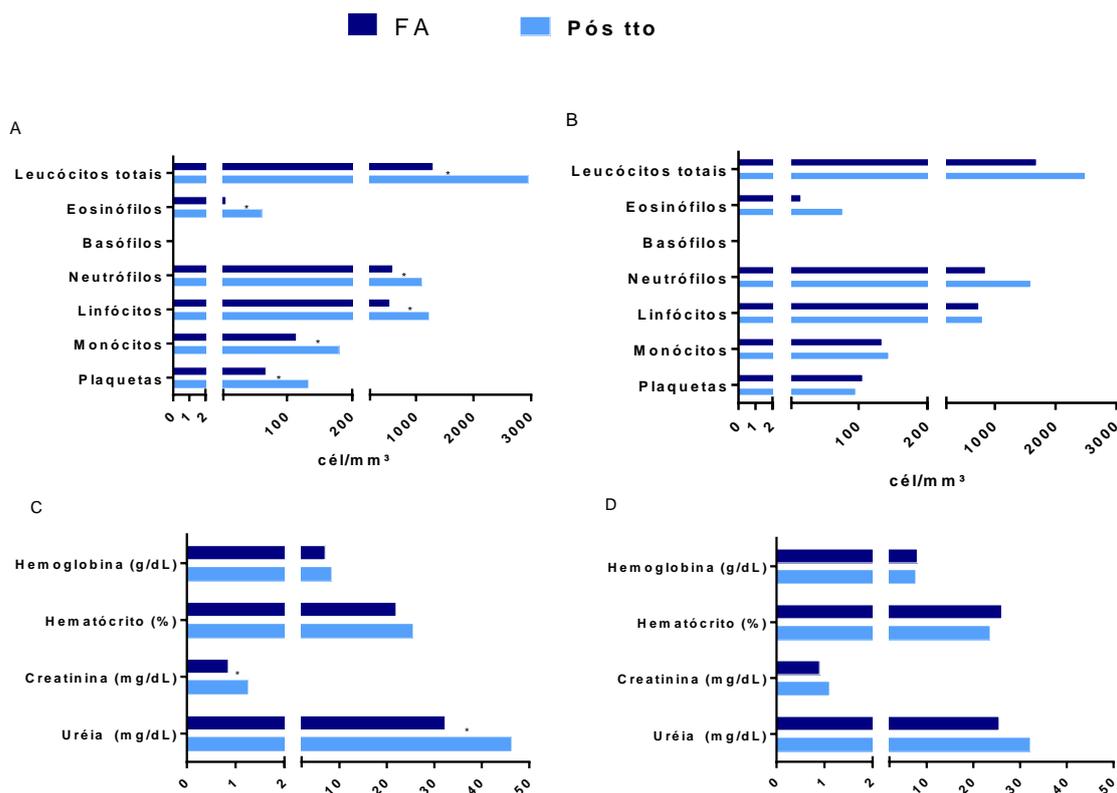


Figura 2: Evolução de índices hematimétricos, leucograma e plaquetas e função renal dos pacientes de leishmaniose visceral não-recidivantes (NR) e recidivantes (R). Comparação entre as medianas dos valores de fases ativa (FA) e após o tratamento imediato (pós-tto) dos pacientes NR (A e C) e R (B e D). * $p < 0,05$.

5.2. Avaliação prospectiva dos níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ antes e após o tratamento da leishmaniose visceral

Todos os pacientes, independentemente de serem ou não recidivantes, apresentaram contagens de linfócitos TCD4⁺ significativamente mais baixas durante a LV ativa em relação aos níveis de normalidade (NR= 312,5 cél/mm³ [205,8-509 cél/mm³] e R= 232 cél/mm³ [76,5-368,5 cél/mm³] e sadios: 1.115 cél/mm³ [630,5-1.258 cél/mm³]). Oito dos 10 pacientes NR avaliados na fase ativa apresentaram contagens de TCD4⁺ abaixo de 500 cél/mm³, enquanto os dois casos restantes apresentaram contagens próximas ao limite inferior da faixa de normalidade (Figura 3A). Dentre os pacientes R, todos apresentavam linfopenia TCD4⁺ pronunciada, com menos de 500 cél/mm³.

No pós-tratamento imediato, observou-se um aumento das contagens de linfócitos TCD4⁺ em relação à fase ativa nos dois grupos (NR: 506 cél/mm³ [360,5-950,5 cél/mm³] e R: 258 cél/mm³ [76,5-368,5 cél/mm³]). É importante notar que a elevação da contagem de linfócitos TCD4⁺ após o tratamento ocorre de forma mais pronunciada nos pacientes NR ($p < 0,05$) (Figura 3A), revelando que os pacientes R parecem apresentar um déficit na capacidade de reconstituição do repertório linfocítico.

O cálculo do ganho de linfócitos T CD4⁺ no pós-tratamento imediato em relação à fase ativa da doença evidenciou uma diferença significativa entre os dois grupos, de modo que a mediana de ganho entre os pacientes NR foi 1,69 vezes [1,41-2,05 vezes], enquanto nos pacientes R foi 0,99 [0,95-1,48] ($p < 0,05$). É possível observar, portanto, que no grupo NR, todos os pacientes apresentaram ganho de linfócitos T CD4⁺ após tratamento eficaz da LV, enquanto o mesmo fenômeno não foi observado em pacientes R. Destaca-se o fato de que três dos cinco pacientes R sofreram redução, ainda que discreta, da contagem desse tipo celular no período avaliado (Figura 3B).

Em avaliação subsequente, após seis meses do tratamento, os pacientes NR ainda mantiveram contagens de linfócitos T CD4⁺ mais elevadas que os pacientes R (NR= 906 cél/mm³ [664-1097 cél/mm³]; R= 532 cél/mm³ [131-532 cél/mm³]) (Figuras 3A e 3B). No entanto, um paciente já apresentava contagens próximas da normalidade já na fase ativa da LV, não tendo sido, portanto, observado ganho celular em relação à fase ativa. Dois pacientes do grupo R mantiveram contagens baixas de linfócitos T CD4⁺ na avaliação após seis meses, havendo ganho de 1,22 vezes (LV09) e 1,30 vezes (LV07) vezes em relação à contagem na fase ativa da doença, enquanto os outros dois pacientes R analisados apresentaram ganho de cerca de três vezes o valor inicial (Figura 3B).

Alguns pacientes foram acompanhados até doze meses após o tratamento, sendo cinco do grupo NR e três do grupo R. Dentre os NR, foi verificada contagens de T CD4⁺ superiores a 800 cél/mm³ em quatro pacientes, com uma mediana de 1.074 cél/mm³ [731,5-1.226 cél/mm³], muito similar àquela encontrada em indivíduos saudáveis (1.115 cél/mm³ [630,5-1.258 cél/mm³]). Apenas um paciente (LV03) manteve contagem de 579 cél/mm³ após um ano de seguimento. Dentre os R, os três pacientes analisados apresentaram comportamento bastante distinto: LV09 manteve níveis menores que 100 cél/mm³ durante todo o período, LV07 duplicou o número de

linfócitos T CD4⁺ em relação aos dados dos seis meses após o tratamento e LV06 manteve níveis elevados, superiores a 1.400 cél/mm³, com ganho de cerca de três vezes o valor inicial apresentado na fase ativa da LV (Figuras 3A e 3C).

Em relação aos linfócitos T CD8⁺ foi observada menor variabilidade de suas contagens ao longo do período de acompanhamento (Figura 3C). Nos pacientes NR, a mediana foi de 289 cél/mm³ [149,5-426 cél/mm³], 349 cél/mm³ [207-416 cél/mm³] e 310 cél/mm³ [254-586 cél/mm³] na fase ativa, imediatamente após o tratamento e seis meses após o tratamento, respectivamente. Dois pacientes já apresentavam níveis de TCD8⁺ na faixa de normalidade na doença ativa e assim se mantiveram nas fases subsequentes, e por isso não apresentaram ganho dessa população. Os pacientes do grupo R apresentaram medianas dessa subpopulação menores do que o grupo NR (fase ativa= 156 cél/mm³ [49,5-305 cél/mm³]; pós-tratamento imediato= 228 cél/mm³ [41-314 cél/mm³] e assim se mantiveram seis meses após tratamento= 236 cél/mm³ [98-575 cél/mm³]). Pode-se observar na figura 3D, que no grupo NR houve ganho de quase 1,87 vezes [0,85-2,36] na mediana da contagem dessas células após seis meses de tratamento em relação à fase ativa. Já no grupo R esse aumento foi menor (1,23 vezes [0,68-2,57]). Apesar de termos analisado um número menor de indivíduos, após doze meses de tratamento específico, a contagem de linfócitos T CD8⁺ ficou bastante similar entre os dois grupos: mediana do grupo NR= 506 cél/mm³ [376-928,5 cél/mm³] e R= 490 cél/mm³ [97-656 cél/mm³], e também muito próxima do valor encontrado nos controles sadios de 507,5 cél/mm³ [435,3-794,8 cél/mm³] (Figuras 3C e 3D).

Interessantemente, as contagens de linfócitos T CD4⁺ se correlacionaram negativamente com o número de episódios totais de LV ($r=-0,41$, $p<0,05$, Figura 4), sugerindo que o comprometimento imunológico está associado às recidivas da LV. Por fim, as contagens de linfócitos T CD8⁺ se correlacionaram positivamente com os níveis de transaminases na fase ativa da doença: contagens de linfócitos T CD8⁺ e AST ($r=0,64$; $p<0,05$) e com ALT ($r=0,63$; $p<0,05$ – dados não mostrados).

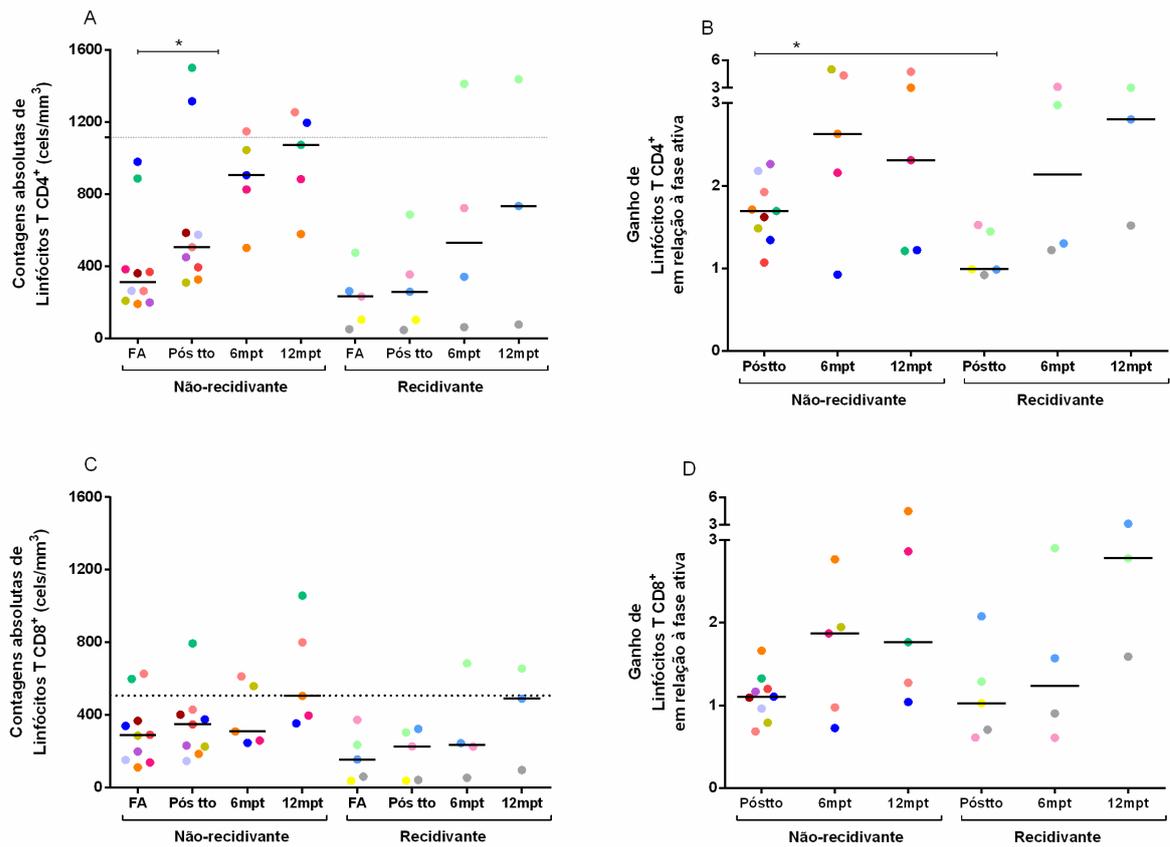


Figura 3: Avaliação do comprometimento e da recuperação imune em pacientes com leishmaniose visceral (LV) ao longo do acompanhamento clínico. Contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (C) por mm³ em pacientes com LV. Ganho de linfócitos T CD4⁺ (B) e T CD8⁺ (D) em relação à fase ativa da doença em pacientes com LV. Cada ponto colorido se refere ao mesmo paciente ao longo das fases do acompanhamento. FA – fase ativa, pós tto – pós-tratamento, 6mpt e 12 mpt – seis e 12 meses pós-tratamento. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo * p<0,05.

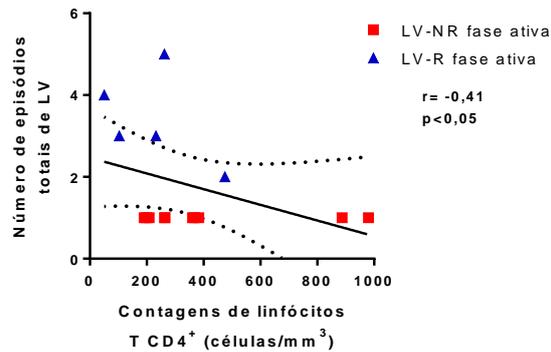


Figura 4: Correlação negativa entre as contagens de linfócitos T CD4+ e o número de episódios totais de leishmaniose visceral. Cada ponto colorido se refere a um paciente dos grupos não-recidivantes (NR) ou recidivantes (R) na fase ativa da doença. Correlação de Spearman, Graph Pad Prism, 6.0.

5.3. Avaliação prospectiva da resposta de linfócitos B por meio da quantificação dos níveis IgG, IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania infantum* em pacientes com leishmaniose visceral

Nessa casuística, observamos elevação pronunciada das globulinas séricas em pacientes R e NR. Sendo assim, foi necessário investigar como se comporta a resposta humoral nesses pacientes. Em relação às imunoglobulinas, conforme esperado, detectamos produção de IgG que reconhece antígenos de *L. infantum* em nossos pacientes com LV. Nos pacientes do grupo NR, os títulos desses anticorpos, expressos por índice de ELISA (IE), foram inferiores aos encontrados nos pacientes R, independente da fase analisada (fase ativa, imediatamente após o tratamento, seis e doze meses após o tratamento, Figura 5A). No grupo NR, foi possível observar que há uma tendência à redução dos títulos de IgG total, com mediana na fase ativa de 249,4 [142,7-522,3] e de 69,30 [32,6-384,5] seis meses após o tratamento, enquanto que pacientes R têm mediana de 318,7 [126,2-485,5] e 312,5 [140,2-408,7] na fase ativa e seis meses após o tratamento, respectivamente (Figura 5A).

Um padrão semelhante pode ser observado em relação ao subtipo IgG1, de modo que, mesmo após seis meses do fim do tratamento, grande parte dos pacientes manteve níveis ainda elevados desse anticorpo. Houve uma tendência de

queda desses níveis, principalmente dentre os NR. Os pacientes NR apresentaram valores inferiores aos pacientes R durante esse seguimento (NR= 20,2 [5,8-126,5]; R= 75,4 [42,8-105,3]) (Figura 5B).

Após 12 meses, observou-se que ambos os grupos apresentaram níveis mais baixos de IgG1, sendo a queda mais pronunciada nos pacientes R (NR= 12,5 [3,8-43,8]; R= 5,6 [1,6-20,5], sem significado estatístico (figura 5B). Em relação aos níveis de IgG1 intra-grupo foi possível verificar nos pacientes NR uma redução da fase ativa em relação ao pós-tratamento ($p < 0,05$), e uma tendência a menores níveis aos 12 mpt ($p = 0,06$). É notável ainda a correlação positiva entre os níveis de IgG1 e IgG total ($r = 0,88$; $p < 0,05$, Figura 6A) e entre os níveis de IgG1 e globulina ($r = 0,81$; $p < 0,05$, Figura 6B) na fase ativa da doença. Após seis ($r = 0,95$; $p < 0,05$) e doze meses ($r = 0,93$; $p < 0,05$) o padrão de correlação entre IgG total e IgG1 se manteve (dados não mostrados). Isto sugere que o comprometimento da globulina nessa população se dá principalmente as custas de IgG1.

A IgG3, por sua vez, apresentou-se de forma distinta. No pós-tratamento imediato, nos pacientes NR, os níveis sofrem redução importante em relação à fase ativa, enquanto no grupo R há redução muito discreta entre os dois momentos (fase ativa: NR= 24,3 [11,2-36,6] e R= 33,1 [29,9-61,8]; após o tratamento: NR= 17,8 [9, 6-35,14]; R= 31,9 [22,2-60,9]) ($p = 0,06$). No seguimento, há uma tendência de redução dos níveis séricos de forma geral, evidenciada na dosagem aos 6mpt, contudo, essa é muito mais pronunciada no grupo NR. Nesses pacientes, a dosagem aos 6mpt se assemelha à encontrada em controles não infectados, sendo que a mediana do nível sérico da IgG3 no grupo R nesse momento é quatro vezes maior que a mediana encontrada em pacientes NR (NR=6,4 [3,9-14,6]; R=27,32 [16,25-54,62]) ($p < 0,05$). Após um ano de acompanhamento, os pacientes R ainda apresentavam níveis de IgG3 aproximadamente três vezes maior que os pacientes NR (NR= 3,6 [2,7-12,2]; R= 12,0 [0,25-90,5]) (Figura 5C). É interessante observar que há uma diferença entre os níveis de IgG3 entre os grupos NR e R a partir do pós-tratamento ($p = 0,06$) e que se mantém aos 6mpt ($p < 0,05$), uma vez que os pacientes NR apresentam níveis séricos inferiores aos pacientes R nessas fases. Além disso, os níveis de IgG3 se correlacionaram negativamente com as contagens de linfócitos T CD4⁺ ($r = -0,52$, $p < 0,05$, Figura 6C) no grupo dos pacientes recidivantes, ratificando os resultados acima de que as contagens de linfócitos T CD4⁺ são menores nesse grupo, ao lado de níveis mais elevados de IgG3 em todas as fases do acompanhamento clínico.

Por fim, os níveis dessa imunoglobulina aos 6mpt da doença mostraram uma correlação positiva com o número de episódios totais de LV, sugerindo que aqueles com mais recidivas apresentaram maiores níveis de IgG3 ($r= 0,77$; $p<0,05$, Figura 6D).

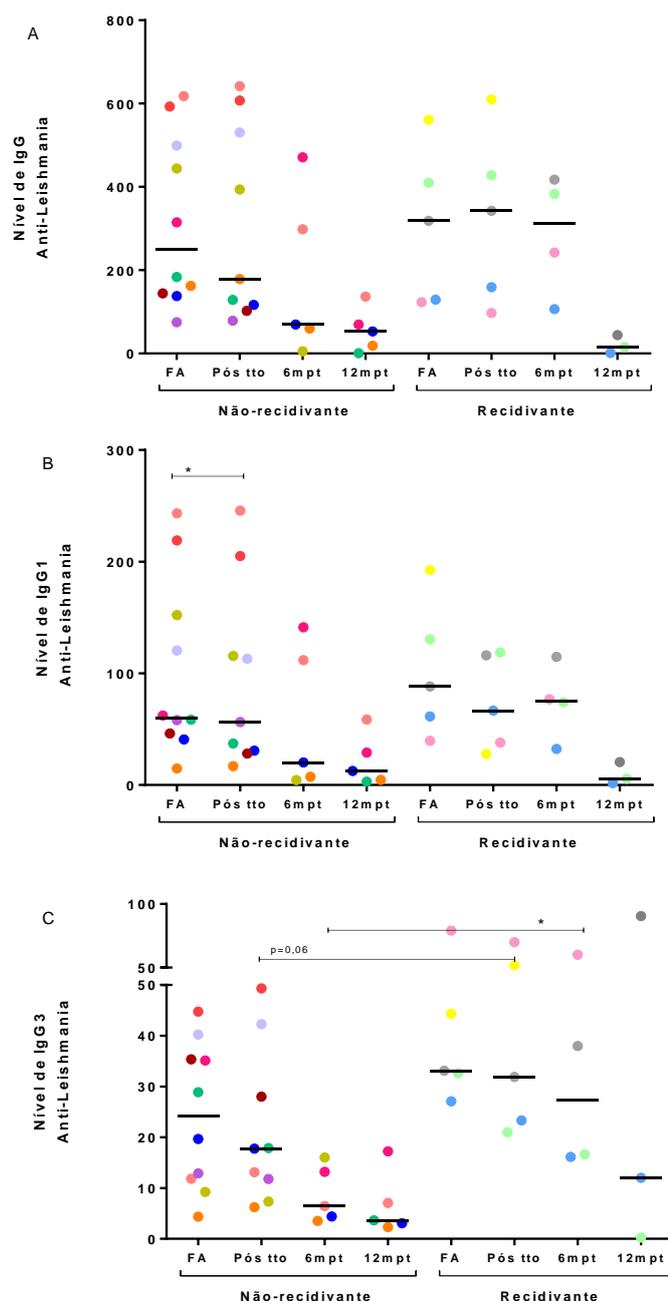


Figura 5: Avaliação prospectiva da resposta de linfócitos B por meio da quantificação de IgG, IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania infantum* em pacientes com LV. Níveis séricos de IgG (A), IgG1 (B) e IgG3 (C) em pacientes com leishmaniose visceral não-recidivantes e recidivantes durante acompanhamento clínico: fase ativa (FA), após o tratamento (Pós tto), seis meses após o tratamento (6mpt) e doze meses após o tratamento (12mpt). Cada ponto colorido se refere ao mesmo paciente ao longo das fases do acompanhamento e as barras horizontais se referem à mediana dos valores. * $p < 0,05$.

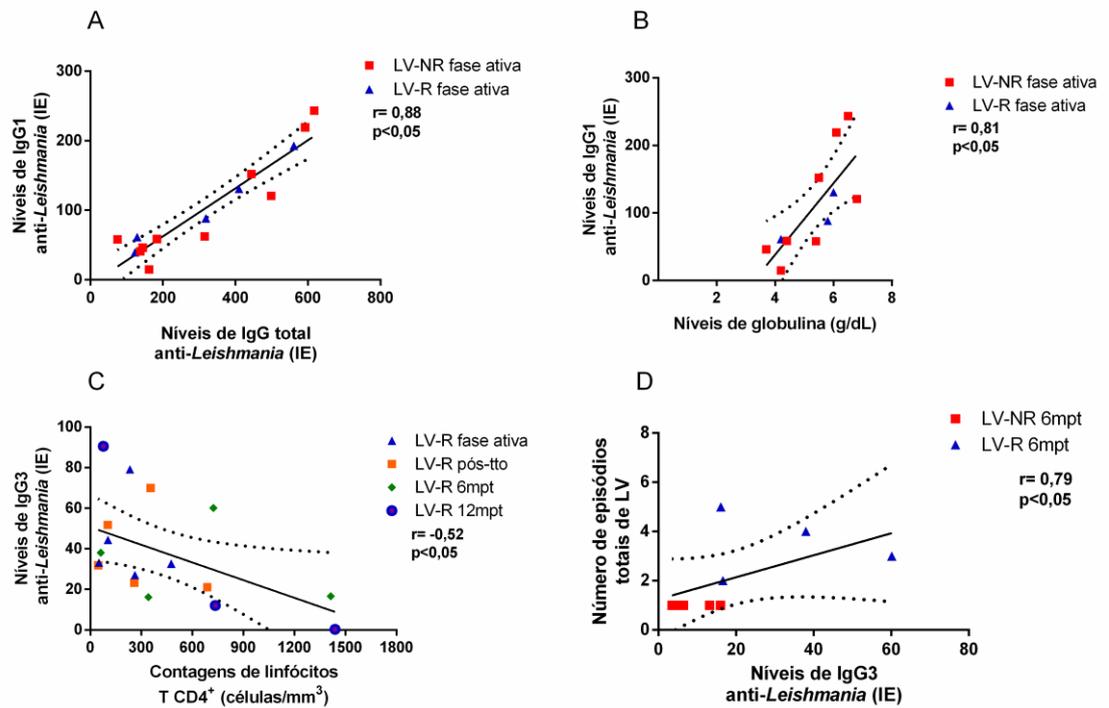


Figura 6: Associações identificadas entre contagens de linfócitos T CD4+ e níveis de imunoglobulinas anti-*Leishmania infantum*, bem como com correlação com o número de episódios de recidivas. Correlação positiva entre os níveis de IgG1 anti-*Leishmania* dos pacientes com leishmaniose visceral não-recidivantes e recidivantes na fase ativa com os níveis de IgG total anti-*Leishmania* (A) e globulina (B), respectivamente. Correlação entre os níveis de IgG3 anti-*Leishmania* e as contagens de linfócitos T CD4+ (C) e o número de episódios totais de recidivas da LV (D), respectivamente. Cada ponto colorido se refere a um paciente do grupo dos pacientes não-recidivantes (NR) ou recidivantes (R) em cada fase do acompanhamento. Correlação de Spearman, Graph Pad Prism, 6.0.

5.4. Avaliação prospectiva dos níveis IL-6 em pacientes com leishmaniose visceral

Nesta casuística, a IL-6 se apresentou elevada na fase ativa nos NR (31,5 pg/mL [2,6-46,0 pg/mL]) e nos R (21,5 pg/mL [0,1-113,4 pg/mL]) em relação aos indivíduos saudáveis, cuja mediana foi de 0,1 pg/ml [0,1-165 pg/ml]. No pós-tratamento imediato, foi possível observar uma redução da IL-6 a níveis próximos de zero na maior parte dos pacientes. Apenas um paciente NR apresentou elevação dos níveis séricos de IL-6 (LV11), que era de 43 pg/mL na fase ativa e houve aumento para

140 pg/mL após o tratamento. Outros dois pacientes, LV12 e LV14, apresentaram redução da IL-6 em relação à fase ativa, mas permaneceram mais elevados que os demais (12,5 pg/mL e 11,1 pg/mL). Dentre os R, apenas um paciente apresentou elevação após o tratamento (LV10), porém, essa foi mais discreta: 0,1 ng/mL para 5,8 ng/mL (Figura 7).

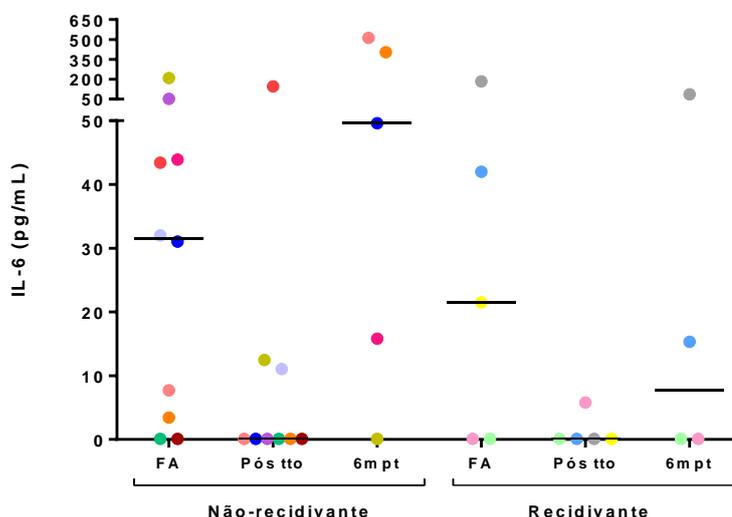


Figura 7: Avaliação prospectiva dos níveis de IL-6 em pacientes com leishmaniose visceral. Níveis plasmáticos de IL-6 em pacientes com leishmaniose visceral não-recidivantes e recidivantes ao longo do acompanhamento clínico: fase ativa FA, após o tratamento (Pós tto) e seis meses após o tratamento (6mpt). Cada ponto colorido se refere ao mesmo paciente ao longo das fases do acompanhamento e as barras horizontais se referem à mediana dos valores. * $p < 0,05$.

Valores menos coesos foram identificados em 6mpt: dentre os cinco pacientes NR, a mediana foi de 49,6 pg/mL [8,0-459 pg/mL] e três pacientes apresentaram aumento de IL-6 de 0,1 pg/mL para 513 pg/mL (LV01), 404,8 pg/mL (LV03) e 49,6 pg/mL (LV04). Nos pacientes R, foram encontrados valores inferiores de IL-6 após seis meses de tratamento, com mediana de 7,7 pg/mL [0,1-69 pg/mL]. Dois pacientes deste grupo apresentaram elevação em relação à fase anterior: LV07, cujos níveis séricos da citocina em questão passaram de 0,1 pg/mL para 15,3 pg/mL, e LV09 com níveis de 0,1 pg/mL no pós tratamento imediato e 86,8 pg/mL após seis meses (figura 6). Três desses pacientes com elevação de IL-6 após seis meses de tratamento também apresentaram o menor ganho de linfócitos T CD4⁺

neste período em comparação com a fase ativa, sendo um NR (LV04 com ganho de 0,9 vezes) e dois R (LV07 – ganho de 1,30; e LV09 – ganho de 1,22) (Figura 3B).

Ao observarmos o comportamento da IL-6 em relação aos dados clínicos da fase ativa e pós-tratamento dos pacientes independentemente de serem ou não recidivantes, foi verificada uma correlação negativa entre o aumento desta citocina com a queda da leucometria ($r = -0,54$; $p < 0,05$, Figura 8A), notadamente dos linfócitos ($r = -0,52$; $p < 0,05$), e também da albumina ($r = -0,49$; $p < 0,05$) (Figuras 8B e 8C, respectivamente). Além disso, os níveis de IL-6 se correlacionaram positivamente com os níveis de proteína C reativa ($r = 0,53$; $p < 0,05$, Figura 8D).

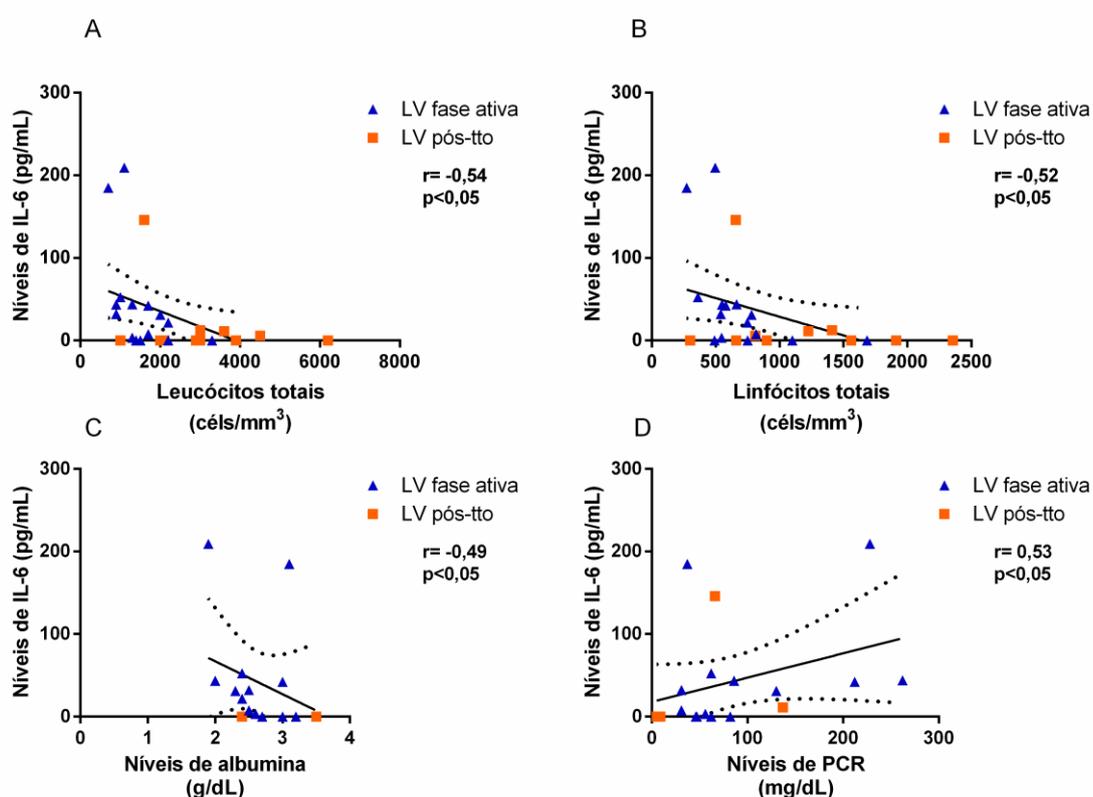


Figura 8: Correlação entre os níveis plasmáticos de IL-6 em pacientes com leishmaniose visceral não-recidivantes e recidivantes na fase ativa e após o tratamento (Pós tto) com as contagens de leucócitos totais (A), linfócitos totais (B), níveis de albumina (C) e níveis de proteína C reativa – PCR (D). Cada ponto colorido corresponde a um paciente ao longo das fases do acompanhamento

6. DISCUSSÃO

A LV é uma doença muito complexa do ponto de vista de sua patogênese, de forma que a resposta imune é fortemente afetada pelo agente infeccioso, pelas características do hospedeiro e possivelmente por particularidades ambientais e dos vetores. Tal fato leva tanto a uma imunodepressão acentuada no que diz respeito à resposta específica contra o parasito, quanto a uma ativação inflamatória intensa, capaz de levar a um grande dano tecidual, resultando em apresentação clínica exuberante e potencialmente fatal (Costa et al 2010; Alvar et al 2012). Um rol de dados clínicos, laboratoriais e imunológicos, com diferentes desfechos, avaliados na literatura mundial tem logrado sucesso em definir fatores de risco na LV para o desencadeamento de quadros graves e óbitos (Cota et al 2011; Costa et al 2012; Costa et al 2016; Gebreyohannes et al 2018).

Outro desfecho, por sua vez, tem chamado a atenção dos estudiosos principalmente nos casos de LV com associação com a infecção por HIV, nos quais se observa maior chance de recidiva após o tratamento adequado da fase ativa (ter Horst et al 2008, Alvar et al 2010, Lindoso et al 2014, Cota et al 2018, Simão et al 2020). Nesse sentido, há trabalhos nessa população tentando descrever os padrões clínicos e imunológicos que definam quais pacientes estão mais suscetíveis a essas recaídas (Cota et al 2011, Silva-Freitas et al 2016, Abongomera et al 2017, Cota et al 2017, Simão et al 2020). Em pacientes imunocompetentes, por sua vez, apesar das recidivas ocorrerem (Gomes 2012, Caldas et al 2015, Coutinho et al 2017), há pouca informação na literatura para o perfil dos pacientes de LV recidivantes. Estudos realizados na Índia (Burza et al 2014), Sudão (Gorski et al. 2010), Georgia (Kajaia et al 2010) e mais recentemente no Brasil (Simão et al 2020) avaliaram retrospectivamente coortes robustas de pacientes LV sem relato de associação com HIV. Estes estudos incluíram majoritariamente crianças (Kajaia et al 2010) ou adultos e crianças (Gorski et al. 2010, Burza et al 2014; Simão et al 2020).

Simão e colaboradores, em estudo recente, por exemplo, analisou retrospectivamente 571 indivíduos com LV e identificou que 38 evoluíram com recidiva. Dentre os 55 pacientes com co-infecção, 15 recidivaram. Por outro lado, dentre os HIV negativos o percentual relatado no artigo foi 4,5% (23 casos). Os índices plaquetários e o edema em membros inferiores foram marcadores para

maior chance de recidivas em pacientes em Bauru – SP, independentemente da infecção por HIV (Simão et al 2020). Gorski e colaboradores, por sua vez, identificaram 621 recidivas dentre 8.800 pacientes e a esplenomegalia volumosa (maior ou igual a grau 3 na classificação de Hackett) na admissão e persistência do aumento do baço na alta hospitalar após o tratamento foram relacionados a um número maior de recaídas (Gorski et al 2010). Na Geórgia, em coorte de 300 indivíduos, atraso no diagnóstico de mais de 90 dias, anemia com hemoglobina inferior a 60 g/L e idade inferior a um ano foram relacionados com mais recidivas (Kajaia et al 2011). Burza e colaboradores, na Índia, publicaram trabalho com 8537 pacientes que não tinham diagnóstico de HIV conhecido e características como sexo masculino, idade menor que cinco anos e maior que 45 anos, esplenomegalia na admissão, pouca diminuição da esplenomegalia durante tratamento hospitalar e, estranhamente, curta duração de sintomatologia antes da busca por tratamento foram identificadas como fatores de risco para recidivas nesses pacientes (Burza et al 2014).

Diante do que foi relatado nesses estudos, é possível observar disparidades nos achados e identificação de poucos marcadores até o momento. No presente estudo, descrevemos prospectivamente quinze pacientes não coinfectados por HIV, recidivantes e não recidivantes, quanto a perfil clínico, laboratorial e de marcadores imunológicos, com intuito de identificar padrões associados a recidivas na LV. Na casuística atual, além do pequeno número de indivíduos analisados, não foi possível inferir associações de características clínicas dos pacientes com recidivas, uma vez os pacientes não apresentavam descrição de todos os dados clínicos nas diferentes fases do acompanhamento.

Clinicamente, a sintomatologia dos pacientes analisados é bastante semelhante na fase ativa, não sendo possível identificar diferenças significativas entre indivíduos recidivantes e não recidivantes. Grande parte dos pacientes apresenta a tríade clássica composta de febre, perda ponderal e esplenomegalia. Todos os pacientes cursaram com pancitopenia, o que também é compatível com o diagnóstico de LV (van Griensven e Diro 2012, Diro et al 2015, Horrillo et al 2019).

De forma surpreendente, os resultados laboratoriais sugerem maior acometimento orgânico em pacientes NR. Esses apresentam alterações mais pronunciadas em relação à funcionalidade da medula óssea, como anemia, leucopenia e plaquetopenia mais acentuadas em relação aos pacientes R. Além

disso, houve maior acometimento hepático, com aumento de AST e bilirrubina direta mais elevada no grupo NR, assim como hipoalbuminemia mais importante. A proteína C reativa, proteína de fase aguda inespecífica, também foi mais elevada na fase ativa em pacientes não-recidivantes.

Uma possível interpretação para tais achados é que esses pacientes R já foram submetidos a tratamento anti-*Leishmania* anteriormente, o que pode ter levado a uma recuperação clínica parcial, com redução dos danos causados pela infecção, mas não o suficiente para evolução do restabelecimento das funções orgânicas. Por outro lado, o primeiro contato com o patógeno, como ocorre em pacientes NR, é capaz de levar a um dano tissular mais acentuado. Tal teoria parece conflitante com o fato já consagrado da LV ser capaz de fazer uma hiperativação imune e que, conforme estudado em pacientes coinfectedos LV/HIV, recidivas da doença estão associadas a inflamação intensa e exaustão celular de linfócitos T (Esch et al 2013, Maran et al 2016, Silva-Freitas et al 2016). É necessário, todavia, considerar que os pacientes recidivantes deste estudo não foram avaliados em seu primeiro episódio de LV e sim após ter tido a doença em pelo menos uma ocasião, o que não nos permite analisar a evolução temporal dos casos. Diante disso, serão necessários trabalhos futuros para avaliar pacientes primoinfectados por *L. infantum* e acompanhá-los prospectivamente, avaliando se o acometimento orgânico mais evidente em pacientes NR encontrado nesta casuística se reproduz entre os grupos de indivíduos que evoluem com e sem recidiva, mas acompanhados desde o episódio inicial da doença.

Posteriormente ao tratamento efetivo da LV, observou-se um aumento dos níveis de leucócitos e plaquetas principalmente em pacientes NR, evidenciando um controle mais adequado da inflamação e conseqüentemente da infecção pelo parasito. Em indivíduos do grupo R, o fenômeno não foi tão pronunciado – o que parece refletir também sobre o déficit na recuperação de linfócitos TCD4⁺. Em se tratando de pacientes com mais de uma recidiva, este comportamento poderia ser, de fato, esperado, tendo em vista que a manutenção do processo infeccioso perpetua os mecanismos fisiopatogênicos associados à disfunção das linhagens linfocíticas.

É importante ressaltar os achados relacionados aos índices plaquetários. Nesta casuística, foi visto que os pacientes NR apresentaram elevação significativa de plaquetas após o tratamento, diferentemente do que é verificado nos pacientes R.

A plaquetopenia já foi associada a maior chance de recidiva na literatura (Simão et al 2020). Ao mesmo tempo, a esplenomegalia também foi associada a recidivas e, como se sabe, o aumento do baço leva a um maior consumo de plaquetas, o que poderia ser um fator confundidor. O baço é, sabidamente, profundamente afetado pelo parasito durante a LV e a esplenomegalia na admissão hospitalar pode, conforme já descrito, ser capaz de refletir gravidade da doença e parasitemia elevada (Costa et al 2016). Além disso, devido a sua importância imunológica, o acometimento esplênico também se relaciona com a imunodepressão encontrada na LV (Gorski et al 2010). Nesse sentido, grande importância terá a avaliação da funcionalidade do baço no contexto da LV ativa.

É crucial, portanto, que sejam desenvolvidas novas pesquisas contemplando a população imunocompetente com objetivo de avaliar fatores de risco do ponto de vista clínico, que possam ser reconhecidos por avaliação médica ou a partir de exames laboratoriais amplamente disponíveis durante abordagem diagnóstica e terapêutica para identificação de indivíduos sob maior risco de recidivas, à luz do que já foi descrito para risco de evolução grave e óbito (Cota et al 2016).

Conforme esperado, a linfopenia foi um achado preponderante tanto nos pacientes NR quanto nos R. Apenas um paciente NR e um R apresentavam os níveis dentro da normalidade, 1.683 cels/mm^3 e 1.100 cel/mm^3 , respectivamente, mesmo assim com números próximos ao limite mínimo de normalidade (920 cel/mm^3). A recuperação dos níveis de linfócitos foi proeminente no grupo NR, tendo ocorrido em seis dos nove pacientes avaliados no pós-tratamento, enquanto os três pacientes R avaliados mantiveram os baixos níveis observados na fase ativa. Esses números se refletiram nas contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺. Foi observado nesta casuística uma grande redução dessas células na fase ativa em ambos os grupos (R e NR) quando comparados aos indivíduos saudáveis. Em pacientes R, o aumento dessas células foi menor que nos pacientes do grupo NR ao longo do acompanhamento. Nesse último grupo, após doze meses de seguimento, os linfócitos T CD4⁺ se aproximaram muito do valor apresentado por indivíduos saudáveis, enquanto que no grupo R a mediana de linfócitos T CD4⁺ era cerca de 35% menor em relação à dos controles.

Em paralelo com esses achados, observa-se um ganho mais rápido de linfócitos T CD4⁺ em pacientes NR. Dessa forma, após o tratamento e no seguimento de seis meses do tratamento, os pacientes NR apresentaram ganho de

T CD4⁺ de 1,7 e 2,6 vezes, respectivamente enquanto os pacientes R não apresentaram ganho em um momento inicial imediatamente após o tratamento e alcançam um ganho de 2,1 vezes de linfócitos TCD4⁺ em relação à fase ativa apenas após os seis meses.

Estudos brasileiros já evidenciaram em pacientes coinfectados LV/HIV, que a baixa contagem de linfócitos T CD4⁺ durante a fase inicial da infecção ativa da LV foi um preditor de mau prognóstico: morte ou recidiva (Cota et al 2011, Távora et al 2015). Mais recentemente, foi visto também em pacientes com infecção simultânea por LV/HIV que, a despeito da contagem de linfócitos T CD4⁺ ser similar entre os grupos na fase de doença ativa, essas células apresentaram aumento significativo no grupo não-recidivante em comparação ao grupo recidivante após 12 meses de acompanhamento (Silva-Freitas et al 2016).

Apesar dos trabalhos anteriores avaliando pacientes coinfectados LV/HIV, ainda existem poucos estudos nos pacientes apenas com LV em relação ao comportamento da resposta imune celular e de sua reconstituição após o tratamento anti-*Leishmania*. No presente trabalho pode ser observado em pacientes sem infecção por HIV que a quantificação de linfócitos T CD4⁺ pode ser considerada um potencial biomarcador para prever recidivas.

Assim, é possível inferir que a LV por si só é capaz de levar à imunossupressão celular pronunciada na fase inicial da doença e que o controle adequado da infecção a longo prazo depende, provavelmente, de uma resposta imune celular decorrente de uma recuperação dos linfócitos T CD4⁺. Esses achados foram reproduzidos por Casado e colaboradores (2015) que, ao analisar pacientes italianos infectados por HIV em estudo transversal, identificou que em coinfectados LV/HIV houve maior grau de inflamação, ativação imune e de imunossenescência em relação aos demais pacientes infectados apenas por HIV, mesmo naqueles com baixa resposta à terapia antirretroviral e pouco controle da viremia.

Resultados de estudo em cães provenientes do estado do Rio de Janeiro mostraram que o timo destes animais infectados é parasitado por *L. infantum*, o que parece levar a prejuízo na maturação de linfócitos T (Da Silva et al 2019). Em paralelo, nossa casuística aponta no sentido de que pacientes incapazes de restaurar as contagens dessas células têm maior chance de recaída da LV. Experimentos futuros avaliando os níveis de emigrantes tímicos recentes na periferia

irão confirmar se, de fato, o que está ocorrendo é uma não-renovação igualitária dessas células pelo timo entre os pacientes com diferentes desfechos clínicos.

Por sua vez, os linfócitos T CD8⁺, até os primeiros seis meses de seguimento, apresentaram sua contagem absoluta menor nos pacientes R em relação aos NR. Apesar disso, o comportamento inicial foi semelhante entre os grupos, com ganho muito discreto desse tipo celular no pós-tratamento imediato. Apesar de resultados em modelos experimentais mostrarem um papel importante dessas células no controle da LV (Tsagozis et al 2003, Tsagozis et al 2005) e estudos apontarem o papel desses linfócitos no processo de cura da leishmaniose cutânea em humanos (Da Cruz et al 1994), os presentes dados não parecem corroborar que tais fatos sejam pertinentes para a LV. Na casuística atual, os pacientes apresentam contagens de linfócitos T CD8⁺ baixas em relação aos indivíduos saudáveis até os seis meses de acompanhamento e na fase ativa se nota uma queda mais acentuada dentre os indivíduos do grupo R em comparação aos NR. Após o tratamento e cura clínica da doença, independente do paciente ser ou não recidivante, não há ganho imediato de linfócitos T CD8⁺ nesse momento. É cabível, então, a inferência de que esses linfócitos têm seu número e função prejudicados durante as fases iniciais diante da inflamação intensa presente na LV. Como há recuperação clínica dos pacientes apesar dessa situação, possivelmente, esse tipo celular não deve ser o principal responsável pela cura e melhora clínica durante o processo inicial.

Com o acompanhamento dos pacientes, é verificado que no grupo NR há ganho de linfócitos T CD8⁺ de aproximadamente duas vezes em relação à fase ativa da doença após seis meses de tratamento, enquanto o grupo R mantém os valores de mediana de contagem absoluta muito semelhantes em relação ao pós-tratamento imediato, com ganho de 1,2 vezes. Esses resultados sugerem que ocorra uma recuperação mais tardia de linfócitos T CD8⁺ nos pacientes R, ou talvez não ocorram de forma alguma em outros, nos quais, após doze meses, o ganho foi de quase três vezes em relação à fase ativa, superando o ganho de pacientes NR e alcançando valores absolutos semelhantes ao do grupo NR e dos controles saudáveis.

Nesse contexto, o conceito de exaustão da resposta celular em doenças que cursam com inflamação crônica, como é o caso da LV, pode ser aplicado. Nessas situações, os linfócitos T CD8⁺ perdem sua funcionalidade (Gautam et al 2014) e passam a apresentar moléculas com função inibidora em sua superfície, como PDL1 e CTLA4 (Day et al 2006, Kaufmann et al 2007), e mais recentemente outros

marcadores, TIM3 e LAG3, foram descritos (Singh et al 2019). Dessa maneira, a função citotóxica de defesa do organismo por parte dessas células está gravemente prejudicada na LV em sua fase ativa. É possível que o aumento mais relevante desses linfócitos só aconteça quando há resolução do processo inflamatório e retorno da sua funcionalidade. Urge a necessidade de investigar a origem dessas células com o objetivo de determinar se a elevação dessas células também decorre de liberação de novas células pelo timo.

Por outro lado, curiosamente houve uma correlação positiva entre os níveis de linfócitos T CD8⁺ e de transaminases. Isto nos levou a levantar a hipótese de que o dano hepático poderia estar associado a uma atividade citotóxica. Tal associação já foi demonstrada na hepatite B (Lopes & Schinoni 2011) e na mononucleose infecciosa por Epstein-Barr (Carvalho et al 1999).

Em paralelo à resposta imune celular, o acompanhamento dos níveis de imunoglobulinas específicas anti-*Leishmania* e suas subclasses após a doença ativa pode ter um significado importante na definição de cura e/ou maior chance de recidiva (Marlais et al 2018, Fievez et al 2019). Neste estudo, em pacientes R, foi visto que os níveis de IgG3 se comportam de forma distinta daqueles que alcançaram a cura clínica sem retorno dos sintomas. Está claro que nesses pacientes do grupo R, os níveis de IgG3 se encontram persistentemente aumentados em relação aos NR, o que pode evidenciar a presença de estímulo contínuo do parasito, sem que tenha havido seu controle completo pelo sistema imunológico do hospedeiro.

Em diversos trabalhos (Ravindran et al 2004, Ganguly et al 2008 e Gomes et al 2010), em infecções tanto por *L. infantum* quanto por *L. donovani*, foi verificada uma redução dos níveis das IgG1 e IgG3 em pacientes que apresentaram cura do ponto de vista clínico alguns meses após o tratamento. Assim como resultados encontrados por Gomes e colaboradores (2010), verificou-se, de uma maneira geral, uma redução significativa de IgG3 em pacientes com LV após seis meses de tratamento. Neste estudo brasileiro não foi levado em consideração a ocorrência de recidivas e comparação entre pacientes com os diferentes desfechos. Ao analisarmos, em nossa casuística, os grupos separadamente, é possível observar que a queda de IgG3 é muito mais importante em pacientes NR.

Em relação à IgG1, os resultados não mostraram diferença significativa entre os dois grupos R e NR, e também entre os períodos analisados – fase ativa, após o

tratamento e seis meses após o tratamento. Contudo, os níveis séricos apresentam tendência de queda em ambos os grupos, principalmente a partir dos seis meses de seguimento. Resultados semelhantes foram observados em outro estudo com IgG1, cujos níveis apresentaram redução mais gradual após cura clínica em relação a outra subclasse em questão, IgG3 (Gomes et al 2010).

Houve ainda, uma correlação positiva entre os níveis séricos de IgG e IgG1, sugerindo que a maior fração dos anticorpos específicos produzidos seja dessa subclasse. Tal achado está de acordo com a literatura, em que vários estudos mostram a predominância da IgG1 em relação à IgG3 (Caldas et al 2005).

Estudos indianos realizados com pacientes infectados com *L. donovani* e presença de IgG1 (Bhattacharyya et al 2014 e Mollet et al 2019) mostraram que os níveis desses anticorpos se mantiveram elevados após o episódio de LV ativa em pacientes que apresentaram recidivas. Em seu trabalho, Mollet e colaboradores (2019) mostraram que os níveis de IgG1 nos pacientes com LV decrescem de forma mais substancial que os níveis de IgG anti-*Leishmania* total e que há diferença significativa entre os níveis encontrados nos pacientes que apresentaram recidivas em relação àqueles que apresentaram cura clínica sem novos episódios da doença. Nesse estudo, foi avaliado inclusive o uso de um teste rápido para IgG1 anti-*Leishmania*, o que poderia ser uma forma eficaz e prática de determinar os pacientes sob maior risco de recidivas.

Neste presente trabalho, observou-se que na LV por *L. infantum*, os níveis de IgG3 podem se comportar de maneira similar aos que foi descrito para IgG1 em infecções por *L. donovani*, uma vez que o encontrado nesse estudo foi uma persistência de níveis elevados dessa imunoglobulina no grupo R. Além disso, nós verificamos que a IgG3 se correlacionou de forma positiva com o número total de episódios de LV, enquanto a relação com a contagem de linfócitos T CD4⁺ foi negativa. Assim, os níveis de IgG3 estão mais elevados em pacientes R e também naqueles que apresentam contagens de T CD4⁺ mais baixas, provavelmente com menor controle parasitário. Esses fatos corroboram a hipótese de que a persistência de níveis aumentados de IgG3 pode estar diretamente associado com a recidiva. A importância disso é substanciar a utilização da IgG3 como um biomarcador de cura clínica após tratamento, especialmente em pacientes infectados por *L. infantum*.

Em um estudo anterior de nosso grupo, já tinha sido visto a possibilidade de utilizar esse substância com propósito semelhante para outras formas de

leishmaniose, como a tegumentar causada por *L. braziliensis* (Fagundes-Silva et al 2012). Neste trabalho foi observado que tanto IgG1 quanto IgG3 eram negativas na maior parte dos pacientes assintomáticos com dois anos de tratamento, e foi sugerido que poderiam funcionar como ferramenta de auxílio na tomada de decisão de interromper o acompanhamento na leishmaniose tegumentar.

Vários questionamentos ainda existem sobre a utilização de IgG1 e IgG3 nesse sentido, visto que ainda não estão definidos os valores de corte adequados para considerar o paciente com maior ou menor risco para recidivas, tão pouco o tempo correto de acompanhamento dos títulos desses anticorpos após o tratamento. Esses fatores serão importantes para nortear a tomada de decisão e de que maneira deve ser realizado o acompanhamento dos pacientes considerados de alto risco.

Por fim, ao analisarmos a IL-6, uma citocina reconhecidamente inflamatória e já associada a prognóstico mais grave na evolução da LV, observamos que existem provavelmente comportamentos distintos de pacientes na fase ativa. Dois pacientes NR e dois pacientes R apresentaram níveis séricos baixos de IL-6, semelhantes aos dos controles sadios (0,1 pg/mL) enquanto um indivíduo de cada grupo apresentou níveis próximos de 200 pg/mL. Seria esperado que pacientes com níveis mais elevados dessa citocina apresentassem quadro clínico mais grave e, de fato, os dois pacientes com níveis mais elevados, LV09 e LV12 apresentaram altos níveis de PCR e pancitopenia acentuada, apesar de nenhum paciente ter evoluído com risco eminente de morte. Observando os quinze pacientes, foi visto também que havia uma relação entre IL-6 e alguns marcadores de gravidade laboratorial, como hipoalbuminemia e leucopenia. Entretanto, em nível individual, outros pacientes apresentaram sinais de gravidade clínica e laboratorial sem relação direta com a IL-6, evidenciando que outros mecanismos na LV podem desencadear quadros graves.

No pós-tratamento, com a redução do processo inflamatório, a maior parte dos pacientes apresentou uma redução nos níveis séricos de IL-6, para valores próximos ao limite de detecção. Surpreendentemente, após seis meses de seguimento há grande variabilidade dos achados entre os pacientes e muitos voltam a apresentar níveis elevados de IL-6 mesmo pertencendo ao grupo NR.

Assim, ainda não temos elementos suficientes, gerados por este estudo, para inferir se a IL-6 pode ter ou não um papel relevante na evolução para recidivas. São necessários, portanto, mais estudos com maior contingente de participantes a fim de descrever e investigar melhor o papel da IL-6 e de outras citocinas inflamatórias no

seguimento desses pacientes, com intuito de definir se há perfil inflamatório capaz de diferenciar os pacientes que irão recidivar.

Diante do exposto, está claro que as recidivas de LV em pacientes HIV negativo configuram um novo desafio, tanto do ponto de vista clínico, na ausência de protocolos terapêuticos bem definidos, quanto do entendimento da patogênese, cujos estudos são centrados principalmente em pacientes coinfetados HIV/LV. Nossos achados sugerem participação da imunidade celular e humoral nesse processo e configuram o passo inicial nessa investigação.

7. CONCLUSÕES

- Apesar de achados clínicos, hematológicos e bioquímicos sugerindo maior acometimento orgânico na fase ativa e também uma recuperação mais eficiente nos pacientes do grupo NR, não foi possível, nesta casuística, definir um perfil clínico capaz de diferenciar de forma significativo tais achados daqueles apresentados pelos pacientes do grupo R.
- Os linfócitos T CD4+ parecem estar envolvidos no controle eficiente do parasito e sua recuperação após o tratamento possivelmente é um dos fatores que impede a ocorrências de recidivas, mesmo em pacientes não coinfectados por HIV.
- A persistência de níveis elevados de IgG3 se mostra como um possível marcador de recidivas em pacientes HIV negativos infectados por *Leishmania infantum*.
- A IL-6 parece ser um marcador de maior gravidade clínica nessa casuística. Entretanto, a atuação desta citocina em relação a recidivas ainda não está estabelecida.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abongomera C, Diro E, Vogt F, Tsoumanis A, Mekonnen Z, Admassu H et al. The Risk and Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients in Ethiopia: A Retrospective Cohort Study. *CID* 2017; 65: 1703-1710.
- Allos H, Al Dulaijan BS, Choi J, Azzi J. Regulatory T cells for more targeted immunosuppressive therapies, *Clin. Lab. Med.* 2019; 39:1–13.
- Alvar J, Velez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012; 7(5): e35671.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(2): 334–59.
- Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LM, Barral A, Barral-Netto M, Malar J. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. 2010; 13: 9-13.
- Andrade TM, Carvalho EM, Rocha H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1990; 162(6):1354.
- Andrade TM, Teixeira R, Andrade JAF, Pereira C, Carvalho EM. Hipersensibilidade do tipo retardado na leishmaniose visceral. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1982; 24: 298-302.
- Ansari N a., Kumar R, Raj a., Salotra P. Elevated levels of IgG3 and IgG4 subclass in paediatric cases of kala azar. *Parasite Immunol.* 2008; 30: 403–409.
- Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2016; 96(1): 24–45.
- Badaro R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM et al. A prospective study os visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis.* 1986; 154 (4): 639.

- Baneth, G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008; 24: 324-330
- Bern C, Haque R, Chowdhury R, Ali M, Kurkjian KM, Vaz L et al. The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in highly endemic Bangladeshi village. *Am J Trop Med Hy.* 2007; 76 (5): 909.
- Bhattacharyya T, Ayandeh A, Falconar AK, Sundar S, El-Safi S, et al. IgG1 as a Potential Biomarker of Post-chemotherapeutic Relapse in Visceral Leishmaniasis and Adaptation to a Rapid Diagnostic Test. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(10): e3273.
- Botana L, Matía B, San Martín JV, Romero-Maté A, Castro A, Molina L et al. Cellular Markers of Active Disease and Cure in Different Forms of *Leishmania infantum*-Induced Disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:381.
- Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1 β and IFN- γ as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008; 25; 8:86.
- Brasil, Ministério da Saúde. Saúde de A a Z: Leishmaniose visceral. Brasília: 2018. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>. Acessado em novembro de 2019.
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: 2016.
- Brenchlet JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006;12 (12): 1365-71.
- Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *The Lancet.* 2018; 15: 951-970.
- Burza S, Sinha PK, Mahajan R, Lima MA, Mitra G, et al. Risk Factors for Visceral Leishmaniasis Relapse in Immunocompetent Patients following Treatment with 20 mg/kg Liposomal Amphotericin B (Ambisome) in Bihar, India. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(1): e2536.
- Buxbaum LU. A detrimental role for IgG and Fc γ R in *Leishmania mexicana* infection. *Immunol Res.* 2008; 42(1–3):197–209.

- Caldas AJM, Lisbôa LLC, Silva PF, Coutinho NPS, SilvaTC. Perfil das crianças com leishmaniose visceral que evoluíram para óbito, falha terapêutica e recidiva em hospital de São Luís, Maranhão. *Rev Pesq Saúde*. 2013; 14(2): 91-95.
- Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, Brodskyn C, Costa J, Barral-Netto M, Barral A. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis*. 2005; 19; 5:113.
- Camargo-Neves VLF, Spínola R, Lage L. A leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: Situação Epidemiológica em 2001-2002. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003; 36 (S II): 27-29.
- Casado JL, Abad-Fernández M, Moreno S, Pérez-Elías MJ, Moreno a, Bernardino JI, Vallejo a. Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-1-coinfected patients. *HIV Med*. 2015; 16: 240–248.
- Carvalho EM, Bacellar O, Barral a., Badaro R, Johnson WD. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest*. 1989; 83: 860–864.
- Carvalho EM, Badaró R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 1985; 76(6): 2066–9.
- Carvalho EM, Bacellar RS. Lymphocyte reactivity to mitogens in American visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 1983; 16: 35-41.
- Carvalho LHFR. Mononucleose infecciosa. *Jornal de Pediatria*. 1999; 75(1): s115-125.
- Centers for Disease Control and Prevention – CDC. Leishmaniasis, 2019. disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>. Acessado em dezembro de 2019.
- Collin S DR, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, Kipngetich S, Davies C. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 612-619.
- Colmenares M, Kar S, Goldsmith-Pestana K, et al. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002; 96 (suppl 1): 3–7

- Costa AS, Costa GC, Aquino DM, Mendonça VR, Barral A, Barral-Netto M, Caldas Ade J. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(6): 735-9.
- Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Rev. Saúde públ, S. Paulo*. 1990; 24: 361-7.
- Costa CHN, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43(4): 386–92.
- Costa DL, Rocha RL, Chaves EBF, Batista VGV, Costa HL, Costa CHN. Predicting death from kala-azar: construction, development, and validation of a score set and accompanying software. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016; 49(6): 728-740.
- Costa DL, Rocha RL, Carvalho RMA, Lima-Neto AS, Harhay MO, Costa CHN, Barral-Neto M, Barral AP. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathogens and Global Health*. 2013; 107(2): 78-87.
- Costa, FAL, Prianti MA, Silva TC, Silva SMMS, Guerra JL, Goto H. T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. *BMC Infectious Diseases*. 2010 (b); 10: 112.
- Costa FAL, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol*. 2003; 40: 677-684
- Cota GF, Sousa MR, Assis TS, Pinto BF, Rabello A. Exploring prognosis in chronic relapsing visceral leishmaniasis among HIV infected patients: Circulating *Leishmania* DNA. *Acta Tropica*. 2017; 172: 186–191.
- Cota GF, de Sousa MR, de Mendonca AL, Patrocinio A, Assuncao LS, de Faria SR, et al. *Leishmania*-HIV co-infection: clinical presentation and outcomes in an Urban Area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(4): e2816.
- Cota, GF, de Sousa, MR, Rabello, A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2011; 5 (6): e1153.
- Coura-Vital W, Marques M.J, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Reis LES et al .Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection

- of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(8): e1291.
- Coutinho JVSC, dos Santos FS, Ribeiro RSP, Oliveira IBB, Dantas VB, Santos ABFS et al. Visceral leishmaniasis and leishmaniasis-HIV coinfection: comparative study *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017; 50(5): 670-674.
- Da Silva AVA, Souza TL, Figueiredo FB, Mendes Jr AAV, Ferreira LC, Figueira CPB et al. Detection of amastigotes and histopathological alteration in the thymus of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Immun, Inflamm, Dis*. 2020; 8: 127-139.
- Da-Cruz AM, Conceicao-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 1994; 62(6): 2614-2618.
- Daher EF, Lima LL, Vieira AP, Nascimento LS, Soares DS, Abreu KL et al. Hemophagocytic Syndrome in children with visceral leishmaniasis. *Pediatr Infect Dis J*. 2015; 34 (12):1311.
- Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al. PD-1 expression on HIVspecific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006; 443: 350-4.
- Dayakar A, Chandrasekaran S, Kuchipudi SV, Kalangi SK. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. *Front. Immunol*. 2019; 10: 670.
- de Camargo-Neves VL, Spinola R, Lage L. American leishmaniasis in the state of Sao Paulo: epidemiological status in 2001–2002. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36 Suppl 2: 27–29.
- Diniz SA, Silva FL, Carvalho Neta AV, Bueno R, Guerra RMSNC, Abreu-Silva AL et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J Infect Developing Countries*. 2008; 2(1): 24-33.
- Diro E, Lynen L, Gebregziabiher B, Assefa A, Lakew W, Belew Z et al. Clinical aspects of paediatric visceral leishmaniasis in North-west Ethiopia. *TMIH*. 2015; 20: 8-16.
- Dos Santos Marques LH, Da Rocha ICM, Reis IA, Da Cunha GMR, Oliveira E, Pfeilsticker TR et al. *Leishmania infantum*: illness, transmission profile and risk

- factors for asymptomatic infection in an endemic metropolis in Brazil. *Parasitology*. 2017; 144(4): 546-56.
- Dos Santos PL, de Oliveira FA, Santos MLB, Cunha LCS, Lino MTB, de Oliveira MFS, et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(1): e0004375.
- Esch KJ, Juelsingaard R, Martinez PA, Jones DE, Petersen CA. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *J Immunol*. 2013; 191(11): 5542–50.
- Fagundes-Silva GA, Vieira-Gonçalves R, Nepomuceno MP, Souza MA, Favoreto JR S, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A. Decrease in anti-Leishmania IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunology*. 2012; 34: 486–491.
- Falci DR & Pasqualotto AC. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. *Clin Biomed Res* 2015; 35(2): 65-82.
- Feleke BE. Nutritional status of visceral leishmaniasis patients: A comparative cross-sectional study. *Clin Nutr ESPEN*. 2019; 33: 139-142.
- Fievez AMdC, Silva-Freitas ML, Sousa AdQ, Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM. Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients. *PLoS ONE*. 2019; 14(3): e0214413.
- Ganguly S, Das NK, Panja M, Pal S, Modak D et al. Increased levels of interleukin-10 and IgG3 are hallmarks of Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2008; 197: 1762–1771.
- Gautam S, Kumar R, Singh N, Singh AK, Rai M, Sacks D et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis*. 2014; 209: 290–299.
- Gebreyohannes EA, Bhagvathula AS, Abegaz TM, Seid MA. Treatment outcomes of visceral leishmaniasis in Ethiopia from 2001 to 2017: a systematic review and meta-analysis. *Infectious Diseases of Poverty*. 2018; 7: 108.
- Gigley JP, Bhadra R, Moretto MM, Khan IA. T cell exhaustion in protozoan disease. *Trends Parasitol*. 2012; 28(9): 377–84.

- Gomes IT, Carvalho SF, Rocha RD, Peruhype-Magalhaes V, Dietze R, et al. Anti-Leishmania chagasi immunoglobulin G3 detected by flow cytometry for early cure assessment in American visceral leishmaniasis. *J Immunol Methods*. 2010; 360: 76–83.
- Gomes MLS. Coinfecção leishmaniose visceral e Aids no Brasil, 2001 a 2010. [Dissertação (Mestrado em Epidemiologia e Saúde Pública)]. Rio de Janeiro. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca; 2012.
- Gonçalves-de-Albuquerque SDC, Pessoa-E-Silva R, Trajano-Silva LAM, Goes TC, Morais RCS, Oliveira CN et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. *Front. Immunol*. 2017; 8: 1437.
- Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol*. 1998; 28(2): 687–95.
- Gorski S, Collin SM, Ritmeijer K, Keus K, Gatluak F, Mueller M, et al. Visceral leishmaniasis relapse in Southern Sudan (1999-2007): a retrospective study of risk factors and trends. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4: e705.
- Goto, H, Prianti, MG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 2009; 51(5): 241-246.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol* 2005. 6: 1123–1132.
- Horrillo L, Castro A, Matía B, Molina L, García-Martínez J, Jaqueti J et al. Clinical aspects of visceral leishmaniasis caused by *L. infantum* in adults. Ten years of experience of the largest outbreak in Europe: what have we learned? *Parasites Vectors*. 2019; 12: 359.
- JawedaJJ, Duttab S , Majumdar S. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; 117: 109098.
- Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994; 88: 386–388.

- Jin HT, Anderson AC, Tan WG, West EE, Ha SJ, Araki K, et al. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(33): 14733–8.
- Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA, Stager S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathog*. 2009; 5(5): e1000431.
- Kajaia M, Morse DL, Kamkamidze G, Butsashvili M, Chubabria G, Zenaishvili O et al. Risk factors for relapse of visceral leishmaniasis in Georgia. *Trop Med Int Health* 2011; 16: 186-92.
- Karmakar S, BhaumikSK, Paul J, De T. TLR4 and NKT cell synergy in immunotherapy against visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog*. 2012; 8: e1002646.
- Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol*. 2007; 8: 1246-54.
- KhademF, Uzonna JE. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. *Future Microbiol*. 2014; 9(7): 901-915.
- Libório AB, Rocha NA, Oliveira MJ, Franco LF, Aguiar GB, Pimentel RS. Acute kidney injury in children with visceral leishmaniasis. *Pediatr Infect Dis J*. 2012; 31(5): 451-4.
- Lima ID, Queiroz JW, Lacerda HG, Queiroz PV, Pontes NN, Barbosa JD et al. *Leishmania infantum* chagasi in northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. 2012; 86(1): 00.
- Lindoso JAL & Lindoso AABP. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 2009; 51(5): 247-253.
- Lopes TGSL & Schinoni MI. Aspectos gerais da hepatite B. *R. Ci. med. Biol*. 2011; 10(3):337-344.
- Luz KG, Tuon FF, Duarte MIS, Maia GM, Matos P, Ramos AMO e Nicodemo AC. Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010; 43(4): 393-395.

- Magalhães LS, Bomfim LGS, Mota SG, Cruz GS, Corrêa CB, Tanajur DM et al. Increased thiol levels in antimony-resistant *Leishmania infantum* isolated from treatment-refractory visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2018; 113(2): 119-125.
- Mahmud IC, Piassini LAS, Mottac F, Behar PRP, Souza GD. Epidemiological aspects of the first human autochthonous visceral leishmaniasis cases in Porto Alegre, Brazil. *braz j infect dis*. 2019; 23(2): 124–129.
- Majumder S, Bhattacharjee S, PaulChowdhury B, Majumdar S. CXCL10 is critical for the generation of protective CD8 T cell response induced by antigen pulsed CpGODN activated dendritic cells. *PLoS One*. 2012; 7: e48727.
- Maran N, Gomes PS, Freire-de-Lima L, Freitas EO, Freire-de-Lima CG, Morrot A. Host resistance to visceral leishmaniasis: evidence and prevention. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2016; 14(4): 435-442.
- Marlais T, Bhattacharyya T, Singh OP, Mertens P, Gillemann Q, Thunissen C et al. Visceral Leishmaniasis IgG1 Rapid Monitoring of Cure vs. Relapse, and Potential for Diagnosis of Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2018; 8: 42.
- Manzano JI, García-Hernández R, Castanys S, Gamarro F. A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(8): 3719-30.
- Medina-Colorado AA, Osorio EY, Saldarriaga OA, Travi BL, Kong F, Spratt H et al. Splenic CD4+ T cells in progressive visceral leishmaniasis show a mixed effector-regulatory phenotype and impair macrophage effector function through inhibitory receptor expression. *PLoS One*. 2017; 12: e0169496.
- Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med* 2005; 201(5): 747–54.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral. Brasília, 2018. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-azar/leishmaniosevisceral/11334-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em Novembro de 2019.

- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: 2017.
- Mody RM, Lakhal-Naouar I, Sherwood JE, Koles NL, Shaw D, Bigley DP et al. Asymptomatic Visceral Leishmania infantum infection in US Soldiers Deployed to Iraq. Clin Infect Dis. 2019; 68 (12): 2036.
- Mollett G, Hinckel BCB, Bhattacharyya T, Marlais T, Singh OP, Mertens P et al. Detection of Immunoglobulin G1 Against rK39 Improves Monitoring of Treatment Outcomes in Visceral Leishmaniasis. CID. 2019; 69: 1130-5.
- Moral L, Rubio EM, Moya M. A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacantíregion (Spain): implications of the epidemiology of Leishmania infantum infection in southern Europe. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002; 96 (2):129.
- Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Junior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie MS, et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon gamma to promote protection against Leishmania infantum infection. J Infect Dis 2015; 211(6): 1015–26.
- Nylen S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. Trends Immunol. 2007; 28: 378–384.
- Oliveira AL, Paniago AM, Dorval ME, Oshiro ET, Leal CR, et al. Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39: 446–450.
- Oliveira-Sena IV, Werneck GL. Risk factors for in-hospital mortality from visceral leishmaniasis: A case-control study. J Infect Public Health. 2019 xx: xx.
- Ouellette M, Légaré D, Haimeur A, Grondin K, Roy G, Brochu C, et al. ABC transporters in Leishmania and their role in drug resistance. Drug Resist Updat. 1998; 1(1): 43-8.
- Organização Pan-Americana da Saúde/Organização mundial da Saúde – OPAS /OMS. Leishmaniasis. Epidemiological report of the Americas. Washington: 2019. Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis. Acessado em dezembro de 2019.
- Pennisi MG, Persichetti MF. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? Veterinary parasitology. 2018; 251: 131-137.

- Pérez-Cabezas B, Cecílio P, Gaspar TB, Gärtner F, Vasconcellos R, Cordeiro-da-Silva A. Understanding Resistance vs. Susceptibility in Visceral Leishmaniasis Using Mouse Models of *Leishmania infantum* Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9: 30.
- Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva LA, Rabello A, Teixeira-Carvalho A et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- γ and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- α monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clinical and Experimental Immunology.* 2006; 146: 124-132.
- Phillips R, Svensson M, Aziz N, Maroof A, Brown N, Beattie L, et al. Innate killing of *Leishmania donovani* by macrophages of the splenic marginal zone requires IRF-7. *PLoS Patho.* 2010; 6(3): e1000813.
- Polley R, Stager S, Prickett S, Maroof A, Zubairi S, Smith DF, et al. Adoptive immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis with CD8+ T cells requires the presence of cognate antigen. *Infect Immun.* 2006; 74(1): 773–6.
- Prefeitura de Belo Horizonte – PBH. Gerência de Controle de Zoonoses/GVSI/SMSA/PBH, 2019. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/sites/default/files/estrutura-de-governo/saude/dados-da-leishmaniose-visceral-no-munic%C3%ADpio-de-belo-horizonte-em-09-04-2019.pdf>. Acessado em dezembro de 2019.
- Prestes-Carneiro LE, Spir PRN, Fontanesi M, Garcia KGB, Silva FA, Flores EF et al. Unusual manifestations of visceral leishmaniasis in children: a case series and its spatial dispersion in the western region of São Paulo state, Brazil. *BMC Infectious Diseases.* 2019; 19:70.
- Profeta da Luz ZM, Pimenta DN, Cabral AL, Fiuza VO, Rabello A. Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001; 34: 249–254.
- Rai AK, Thakur CP, Singh A, Seth T, Srivastava SK, Singh P et al. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. *PLoS One.* 2012; 7: e31551

- Ravindran R, Anam K, Bairagi BC, Saha B, Pramanik N, et al. Characterization of Immunoglobulin G and Its Subclass Response to Indian Kala-Azar Infection before and after Chemotherapy. *Infection and Immunity*. 2004; 72: 863–870.
- Rocha AVVO, Moreno BFS, Cabral AD, Louzeiro NM, Miranda LM, Santos VMB et al. Diagnosis and epidemiology of *Leishmania infantum* in domestic cats in an endemic area of the Amazon region, Brazil, *Veterinary Parasitology* – aprovado em 2019.
- Rodrigues V, Laforge M, Campillo-Gimenez L, Soundaramourty C, Correia de-Oliveira A, Dinis-Oliveira RJ, et al. Abortive T follicular helper development is associated with a defective humoral response in *Leishmania infantum*-infected macaques. *PLoS Pathog*. 2014; 10(4): e1004096.
- Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasites & Vectors* 2016; 9:118.
- Rodrigues da Silva J.. *Leishmaniose visceral (calazar)*. Tese de concurso para provimento efetivo do cargo de professor catedrático da cadeira de Clínica das Doenças Tropicais e Infecciosas da Faculdade Nacional de Medicina da Universidade do Brasil. Sociedade Editora e Gráfica Ltda. 498 páginas, 1957.
- Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latinamerica – a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Jan 19; 4(1): e584.
- Romero GA, Costa DL, Costa CHN, de Almeida RP, de Melo EV, de Carvalho SFG et al. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(6): e0005706.
- Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2014; 3: 251–262.
- Rosas LE, Snider HM, Barbi J, Satoskar AA, Lugo-Villarino G, Keiser T et al. Cutting edge: STAT1 and T-bet play distinct roles in determining outcome of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. *J Immunol*. 2006; 177(1):22–5.
- Rossi M, Fasel N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *International Immunology*. 2017; 30(3): 103-111.

- Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune responses in kalaazar. *Indian J Med Res.* 2006; 123(3): 245-66.
- Santos-Oliveira JR, Regis EG, Leal CRB, Cunha RV, Bozza PT, Da-Cruz AM. Evidence that lipopolysaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2011; 5(7): e1198.
- Schaut RG, Lamb IM, Toepp AJ, Scott B, Aguiar COM, Coutinho JFV, Jeronimo SMB, Wilson ME, Harty JT, Waldschmidt TJ, Petersen CA. Regulatory IgDhi B Cells Suppress T cell Function via IL-10 and PD-L1 During Progressive Visceral Leishmaniasis. *J Immunol.* 2016; 196(10): 4100-4109.
- Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* 2014; 35(2): 51–60.
- Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010, 125: S41–52.
- Shreffler WG, Burns Jr JM, Badaro R, Ghalib HW, Button LL, McMaster WR et al. Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. *J Infect Dis.* 1993; 167(2): 426–30.
- Silva GAR, Boechat TO, Ferry FRA, Pinto JFC, Azevedo MCVM, Carvalho RS, Motta RN, Veras MF. First case of autochthonous human visceral leishmaniasis in the urban center of Rio de Janeiro: case report. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2014; 56(1): 81-4.
- Silva-Freitas ML, Cota GF, Machado-de-Assis TS, Giacoia-Gripp C, Rabello A, Da-Cruz AM et al. Immune Activation and Bacterial Translocation: A Link between Impaired Immune Recovery and Frequent Visceral Leishmaniasis Relapses in HIV-Infected Patients. *PLoS ONE.* 2016; 11(12): e0167512.
- Simão JC, Victória C, Fortaleza CMCB. Predictors of relapse of visceral leishmaniasis in inner São Paulo State, Brazil. *Int J Infect Dis.* 2020; pii: S1201-9712(20)30086-2.
- Singh B, Bhushan Chauhan S, Kumar R, et al. A molecular signature for CD8+ T cells from visceral leishmaniasis patients. *Parasite Immunol.* 2019; 41: e12669.
- Singh N, Kumar R, Chauhan SB, Engwerda C, Sundar S. Peripheral Blood Monocytes With an Antiinflammatory Phenotype Display Limited Phagocytosis

- and Oxidative Burst in Patients With Visceral Leishmaniasis. *JID*. 2018; 218: 1130-1141.
- Singh OP, Hasker E, Sacks D, Boelaert M, Sundar S. Asymptomatic Leishmania infection: a new challenge for Leishmania control. *Clin Infect Dis*. 2014; 58(10):1424.
- Smelt SC, Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. B cell-deficient mice are highly resistant to Leishmania donovani infection, but develop neutrophil mediated tissue pathology. *J Immunol*. 2000; 164(7): 3681–8.
- Souza MA, Sabroza PC, Marzochi MC, Coutinho SG, Souza WJ. Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro. Flebotomíneos da área de procedência de caso humano autóctone. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1981; 76: 161-8.
- Sundar S, Agrawal NK, Sinha PR, Horwith GS, Murray HW Short-course, low-dose amphotericin B lipid complex therapy for visceral leishmaniasis unresponsive to antimony. *Ann Intern Med*. 1997;127(2):133-7.
- Távora LGF, Nogueira MB, Gomes ST. Visceral Leishmaniasis/HIV co-infection in northeast Brazil: evaluation of outcome. *Braz J Infect dis*. 2015; 19(6): 651–656.
- Thomas BN, Buxbaum LU. FcγRIII mediates immunoglobulin G induced interleukin-10 and is required for chronic Leishmania mexicana lesions. *Infect Immun*. 2008; 76(2): 623–31.
- Tsagozis P, Karagouni E, Dotsika E. Function of CD8+ T lymphocytes in a selfcuring mouse model of visceral leishmaniasis. *Parasitol Int*. 2005;54(2):139-46.
- Tsagozis P, Karagouni E, Dotsika E. CD8(+) T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2003; 25 (11–12): 569-79.
- ter Horst R, Collin SM, Ritmeijer K, Bogale A, Davidson RN. Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. *Clin Infect Dis*.2008; 46(11):1702
- Van Griensven J & Diro E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2019; 33(1): 79-99.

- Van Griensven J & Diro E. Visceral Leishmaniasis. *Infect Dis Clin N Am*. 2012; 26: 309-322.
- Viana AG, Magalhães LMD, Giunchetti RC, Dutra WO, Gollob KJ. *Leishmania infantum* induces expression of the negative regulatory checkpoint, CTLA-4, by human naïve CD8+ T cells. *Parasite Immunology*. 2019; 00: e12659.
- Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection*. 2003; 31:174-177.
- Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15(8): 486–99.
- Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011; 12(6): 492–9.
- WHO – World Health Organization. *Leishmaniasis*, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis>. Acessado em dezembro de 2019.

9. ANEXOS

9.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Voluntários - Pacientes

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

Instituição Responsável: _____

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

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

Nos casos de **leishmaniose sem AIDS**, você também poderá fazer parte do estudo caso seja de sua vontade. Os indivíduos que tiverem a **infecção pelo HIV, sem leishmaniose** também podem ser incluídos no estudo caso queiram. Nos casos de indivíduos saudáveis, você também poderá fazer parte deste estudo. O seu acompanhamento clínico estará garantido independente de apresentar as duas, ou mesmo uma das doenças, bem como independente de sua decisão de participar ou não do estudo.

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

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

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

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

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

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

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

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

ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

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

RISCOS DA COLETA DE SANGUE E MATERIAIS BIOLÓGICOS:

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

Esclarecimentos sobre os outros procedimentos e inconvenientes:

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

Para o diagnóstico também será realizada uma biópsia da úlcera para quem tem suspeita de doença na pele, ou para quem tem suspeita de doença nas vísceras será retirado sangue da

medula para a realização do diagnóstico. Os indivíduos alérgicos ao anestésico NÃO poderão fazer biópsia. As complicações que podem ocorrer são dor e sangramento local que regredem geralmente ao final de dois a três dias. A biópsia é feita com anestésico local a nível ambulatorial. Não aplicável se você for um indivíduo saudável e sem suspeita de leishmaniose.

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

PARTICIPAR DO ESTUDO TRAZ BENEFÍCIOS?

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

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

E O SIGILO?

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

QUAIS SÃO OS CUSTOS ENVOLVIDOS?

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

RECEBEREI ALGUM PAGAMENTO?

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

O QUE ACONTECE SE EU SOFRER ALGUM DANO?

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

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS COMO PARTICIPANTE DE PESQUISA?

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

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

O QUE DEVO FAZER SE TIVER DÚVIDAS OU DIFICULDADES?

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

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

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

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

PÁGINA DE ASSINATURAS

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

Nome do participante
(em letras de forma)

Assinatura do participante e data

Nome do responsável legal
(em letras de forma)

Assinatura do responsável legal e data

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

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

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

Assinatura da testemunha e data
(se necessário)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Voluntários - Sadios

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

Instituição Responsável: _____

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

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

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

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

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

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

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

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

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

ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Caso você autorize o armazenamento do restante das suas amostras, estas ficarão estocadas no laboratório na Fiocruz-RJ e serão utilizadas só até dois anos após a finalização do acompanhamento clínico-laboratorial dos pacientes. Além disso, essas

amostras restantes só serão utilizadas novamente, mediante seu novo consentimento e autorização do Comitê de Ética da instituição. Você poderá pedir informações associadas ao seu material biológico humano armazenado a qualquer momento. Após esse período, elas serão descartadas completamente. A pesquisadora responsável pelo biorrepositório será a Dra. Alda Da-Cruz do LIPMed (tel:21-2562-1034).

RISCOS DA COLETA DE SANGUE E MATERIAIS BIOLÓGICOS:

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

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

PARTICIPAR DO ESTUDO TRAZ BENEFÍCIOS?

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

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

E O SIGILO?

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

QUAIS SÃO OS CUSTOS ENVOLVIDOS?

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

RECEBEREI ALGUM PAGAMENTO?

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

O QUE ACONTECE SE EU SOFRER ALGUM DANO?

Se você sofrer algum dano em decorrência da participação no estudo, você receberá imediatamente o tratamento adequado para suas lesões através do Centro de Referência

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

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS COMO PARTICIPANTE DE PESQUISA?

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

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

O QUE DEVO FAZER SE TIVER DÚVIDAS OU DIFICULDADES?

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

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

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

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

PÁGINA DE ASSINATURAS

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

Nome do participante
(em letras de forma)

Assinatura do participante e data

Nome do responsável legal
(em letras de forma)

Assinatura do responsável legal e data

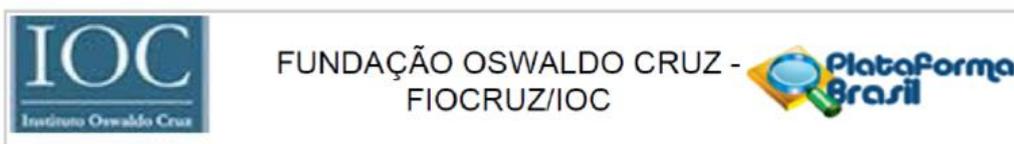
Nome do membro da equipe
responsável pela obtenção
do consentimento
(em letra de forma)

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

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

Assinatura da testemunha e data
(se necessário)

9.2. Aprovações no Comitê de Ética em Pesquisas com seres humanos (IOC, HEM/FHEMIG, Centro de Pesquisa René Rachou)



Continuação do Parecer: 2.121.284

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_880170.pdf	09/05/2017 13:57:34		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_2017.doc	09/05/2017 13:56:32	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2017.doc	09/05/2017 13:56:18	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_pesquisador_SP.pdf	14/04/2017 09:22:28	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_pesquisadora_ceara.pdf	14/04/2017 09:12:25	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_pesquisador_ceara.pdf	14/04/2017 09:10:38	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	14/04/2017 09:02:30	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 14 de Junho de 2017

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

HOSPITAL EDUARDO DE
MENEZES/ HEM/ FHEMIG



Continuação do Parecer: 2.630.609

Deverão ser colocados no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido os dados de contato do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Eduardo de Menezes:

Endereço: Rua Dr. Cristiano Resende, 2213 - Bonsucesso. Belo Horizonte.

Telefone: 31-3328-5084.

E-mail: hem.cep@fhemig.mg.gov.br

Informar periodicamente ao CEP/HEM, resultados parciais e resultado final da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 02 de Maio de 2018

Assinado por:

JADER BERNARDO CAMPOMIZZI
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Cristiano Rezende, 2213

Bairro: Bonsucesso

CEP: 30.622-020

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3328-5084

Fax: (31)3328-5006

E-mail: hem.cep@fhemig.mg.gov.br

Continuação do Parecer: 2.141.103

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

São apresentados dois TCLE:

Para Pacientes em investigação de co-infecção Leishmania/HIV e outro para Voluntários - Pacientes.

Recomendações:

Recomenda-se anexar o documento de Anuência dos pesquisadores do Instituto de Pesquisa René Rachou.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está suficientemente claro em seus propósitos e devidamente fundamentado sob o ponto de vista técnico e ético.

Apresenta a de forma clara os TCLE.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Instituto Oswaldo Cruz em 13/06/2017.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após submissão e análise criteriosa do protocolo em questão, constatamos que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Reguladoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPqRR/FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições a ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto. Firma-se, diante deste documento, a necessidade de serem apresentados os relatórios anuais e final, bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715
Bairro: Barro Preto CEP: 30.190-002
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3349-7825 Fax: (31)3349-7825 E-mail: cepsh-cpqr@cpqr.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



Continuação do Parecer: 2.141.103

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 27 de Junho de 2017

Assinado por:
MARCELO PASCOAL
(Coordenador)