

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LARISSA DI LEO NOGUEIRA COSTA

**PERFIL DE CITOCINAS E DESFECHO CLÍNICO DE
PACIENTES COINFECTADOS HIV E *LEISHMANIA SPP.***

São Luís

2022

LARISSA DI LEO NOGUEIRA COSTA

**PERFIL DE CITOCINAS E DESFECHO CLÍNICO DE
PACIENTES COINFECTADOS HIV E *LEISHMANIA SPP.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa Dra Conceição de Maria Pedrozo Silva de Azevedo.

São Luís

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Costa, Larissa Di Leo Nogueira.

Perfil de citocinas e desfecho clínico de pacientes
coinfetados HIV e Leishmania spp / Larissa Di Leo
Nogueira Costa. - 2023.

86 f.

Orientador(a): Conceição de Maria Pedrozo Silva de
Azevedo.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2023.

1. AIDS. 2. Leishmaniose Visceral. 3. Resposta
Inflamatória. I. Azevedo, Conceição de Maria Pedrozo
Silva de. II. Título.

LARISSA DI LEO NOGUEIRA COSTA

Perfil de citocinas e desfecho clínico de pacientes coinfectados HIV e *Leishmania spp.*

Qualificação da tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Peireira (1º Examinador)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Profa. Dra. Marcia Cristina Gonçalves Maciel (2º Examinador)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Profa. Dra. Arlene de Jesus Mendes Caldas (3º Examinador)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof. Dr. Daniel Wagner de Castro Lima Santos (4º Examinador)
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof. Dr. Vandilson Pinheiro Rodrigues (1º Suplente)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles (2º Suplente)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof. Dr. Lívio Martins Costa (3º Suplente)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof. Dra. Vanessa Moreira da Silva Soeiro (4º Suplente)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

“Se, na verdade, não estou no mundo para simplesmente a ele me adaptar, mas para transformá-lo; se não é possível muda-lo sem um certo sonho ou projeto de mundo, devo usar toda possibilidade que tenha para não apenas falar de minha utopia, mas participar de práticas com ela coerentes.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus, por me dar oportunidades, suporte e forças para que, mesmo em meio a situações tão avessas como o enfrentamento da dor e calamidade de saúde vivenciadas os últimos anos com a pandemia (covid-19), me conduziu para que pudesse manter de pé meus objetivos e sonhos.

A Universidade Federal do Maranhão que é a minha verdadeira casa, onde construí todo o conhecimento profissional até aqui e onde tenho o prazer em retornar como docente para retribuir seus ensinamentos. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPCS), pela oportunidade de realizar o doutorado e por todo suporte dado para que conseguíssemos chegar até este momento.

A minha inspiração e orientadora Profa Dra Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo, que sempre foi minha admiração profissional e pessoal, que me ensinou esse amor pela infectologia e pelo paciente, me mostrando muito além da literatura, me ensinando a ser um ser humano melhor e mais capacitado para que pudesse tratar outros seres humanos.

Aos professores Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos e Paulo Vitor Soeiro Pereira coordenadora e vice, respectivamente, do PPGCS, por todo seu empenho, compreensão e dedicação em elevar o nível e a qualidade do PPGCS e da UFMA. Assim como, meu agradecimento aos demais professores do PPGCS e da UFMA por todos os ensinamentos, experiências e conselhos que nos moldaram e nos mostraram os melhores caminhos a seguir profissionalmente.

A minha mãe, Gilsilene Ferreira Nogueira Lima, por ser essa super heroína, meu suporte e minha fortaleza e a minha irmã, Carina Di Leo Nogueira Costa, que é parte incondicional de mim. Sem essas duas mulheres fortes na minha vida, eu não conseguiria alcançar nem metade do que sou hoje como pessoa e como profissional. Aos meus pais, Emerson Pereira Lima e Eleotério Rodrigues Costa, por estarem sempre do meu lado e apoiando minhas escolhas.

Aos meus amigos Dannúbia Miranda, Vanessa Moreira, Lima Junior e Adrielly Coimbra que me apoiaram, me aconselharam e estiveram ao meu lado nos momentos mais estressantes. As minhas amigas Luciana Batalha e Raquel Aciole que além de me apoiarem e não me deixarem desistir, cuidaram de mim e fizeram parte de cada detalhe deste processo.

A toda a equipe do UnaSUS/UFMA em especial as figuras da coordenadora Paola Trindade, as supervisoras Thalya Maciel e Mizraim Mesquita e a colaboradora Karoline Trindade por serem grandes inspirações profissionais, compreenderem, apoiarem e me incentivarem em toda a jornada desse processo.

As minhas amigas e grandes companheiras de pesquisa Uiara Lima e Simara Passos que me deram todo suporte para que pudéssemos aprofundar na pesquisa sobre o paciente HIV com Leishmaniose Visceral e que sempre me apoiaram mesmo nos momentos mais difíceis da pesquisa.

A toda equipe de trabalho do Hospital Presidente Vargas. A toda a minha família e amigos que estiveram presentes durante essa trajetória, sem vocês eu não conseguiria.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária endêmica, e o seu quadro clínico é agravado em coinfeções com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Nestes pacientes, observa-se uma resposta imunitária complexa, com correlação de citocinas pró, anti-inflamatórias e moduladoras. O objetivo deste estudo é identificar o perfil de citocinas e os desfechos apresentados pelos pacientes coinfectados LV/HIV. Foi realizado um estudo prospectivo, longitudinal de Janeiro de 2013 a Julho de 2020 com 169 pacientes coinfectados com LV e HIV. Os resultados investigados foram a ocorrência de recidiva da LV, o óbito hospitalar dos pacientes coinfectados e a clínica apresentada pelos pacientes coinfectados. Para a análise estatística foram realizados o teste Qui-quadrado, o teste Mann-Whitney e as medições de Odds Ratio. Como principais resultados, no presente estudo as taxas de ocorrência foram de 41,4% para a recidiva da LV e 5,5% para a morte. A esplenomegalia e adenomegalia foram associadas ao aumento do risco de recidiva da LV. A perda de peso e edema foram associados com o aumento do risco de morte. Os doentes com recidiva tinham níveis mais elevados de ureia ($P = .005$) e creatinina ($P < .001$). Os doentes que morreram tinham uma contagem mais baixa de glóbulos vermelhos ($P = .012$), hemoglobina ($P = .017$) e plaquetas ($P < .001$). Dentre a amostra de 169 coinfectados, 50 pacientes foram separados por amostra primária para a realização de coleta das amostras de sangue e analisado a liberação de citocinas. Observou-se que havia uma diferença estatisticamente significativa na produção de IL-2 e IL-10 entre os grupos. Além disso, em pacientes co-infectados existe uma correlação positiva moderada ou forte e estatisticamente significativa na produção de IL-2 e IL-4; IL-2 e IL-6; IL-4 e TNF; IL-4 e IL-6; IL-6 e TNF. Os resultados sugerem que os fatores clínicos e laboratoriais mostram associações com os resultados de recaída da LV e morte em pacientes coinfectados com LV/HIV, porém, não houve associação das citocinas produzidas com a clínica apresentada.

Keywords: Resposta inflamatória. Leishmaniose visceral. AIDS. Maranhão-Brasil

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is an endemic parasitic disease in Latin America, and its clinical picture is aggravated in co-infections with human immunodeficiency virus (HIV). In these patients, a complex immune response is observed, with correlation of pro-, anti-inflammatory and modulating cytokines. The aim of this study is to identify the profile of inflammatory cytokines and the outcomes presented by VL/HIV coinfecting patients. A prospective, longitudinal study was conducted from January 2013 to July 2020 among 169 patients coinfecting with VL and HIV. The outcomes investigated were the occurrence of VL relapse, hospital death of coinfecting patients, and the clinical presentation of coinfecting patients. For statistical analysis, the Chi-square test, the Mann-Whitney test and Odds Ratio measurements were performed. As main results, in the present study the occurrence rates were 41.4% for VL relapse and 5.5% for death. Splenomegaly and adenomegaly were associated with increased risk of VL relapse. Weight loss and edema were associated with increased risk of death. Patients with relapse had higher levels of urea ($P = .005$) and creatinine ($P < .001$). Patients who died had lower red blood cell ($P = .012$), hemoglobin ($P = .017$), and platelet ($P < .001$) counts. Among the sample of 169 coinfecting patients, 50 patients were separated by primary sample separation to perform blood sample collection and analyzed for cytokine release. It was observed that there was a statistically significant difference in IL-2 and IL-10 production between the groups. Furthermore, in co-infecting patients there is a moderate or strong and statistically significant positive correlation in the production of IL-2 and IL-4; IL-2 and IL-6; IL-4 and TNF; IL-4 and IL-6; IL-6 and TNF. The results suggest that clinical and laboratory factors show associations with the outcomes of VL relapse and death in VL/HIV coinfecting patients, however, there was no association of the cytokines produced with the clinical presented.

Keywords: Inflammatory response. Visceral Leishmaniasis. AIDS. Maranhão-Brazil.

LISTA DE SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
DIP	Doença Infecto Parasitárias
EFZ	Efavirenz
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
SINAN	Sistema de Investigação e Notificação de Agravos Nacional
SICLON	Sistema de Controle e Logística Nacional
TARV	Tratamento Antirretroviral
TNF	Tenofovir
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
3TC	Lamivudina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1.	Epidemiologia.....	14
2.2.	Leishmaniose Visceral.....	16
2.3.	HIV.....	17
2.4.	Coinfecção Leishmania/HIV.....	20
3.	OBJETIVOS.....	23
3.1.	Objetivo Geral.....	23
3.2.	Objetivos Específicos.....	23
4.	METODOLOGIA.....	24
4.1.	Desenho do estudo.....	24
4.2.	Delineamento do estudo.....	24
4.2.1	Local do estudo.....	24
4.2.2.	População do estudo.....	24
4.2.3.	Fluxograma de pesquisa.....	24
4.2.4.	Investigação clínica.....	25
4.2.5.	Avaliação das citocinas.....	25
4.3.	Análise Estatística.....	30
4.4.	Comitê de ética.....	30
	REFERÊNCIAS.....	32
5.	RESULTADOS.....	34
5.1.	Factors associated with relapse and hospital death in patients coinfected with visceral leishmaniasis/HIV.....	36
5.2.	Perfil sérico Th1/Th2/Th17 de citocinas em pacientes co- infectados com LV/HIV em região altamente endêmica.....	59
	ANEXO.....	73

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma doença zoonótica de transmissão vetorial que representa um desafio para a saúde pública mundial, principalmente devido à sua recente expansão para áreas urbanas de médio e grande porte, além de altas taxas de mortalidade associadas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2022), estima-se 50.000 a 90.000 de novos casos de Leishmaniose em todo o mundo anualmente, com cerca 20.000 a 40.000 mortes por ano; 90% desses números estão concentrados em dez países (Brasil, China, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Iêmen) (WHO, 2022).

A LV é uma doença sistêmica que, associando-se a determinadas condições de saúde como a desnutrição e condições imunossupressoras pode ter seu quadro agravado, um exemplo disto é a coinfeção da *Leishmania spp* com o Vírus da Imunodeficiência Humana, ou, do inglês, *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (WHO, 2022).

As manifestações clínicas mais comuns na LV são a febre, o emagrecimento, a hepatoesplenomegalia e as alterações hematológicas. Esses sinais e sintomas são influenciados pela resposta imune do hospedeiro onde, após a infecção parasitária, a resposta imune inata é desencadeada. Porém, quando o macrófago não consegue inibir a replicação parasitária pela supressão de Espécies Reativas de Nitrogênio e Oxigênio (ROS/ RNS) existe progressão da doença (SILVA et al, 2022).

Alguns estudos sugerem o desenvolvimento de formas clínicas mais relevantes associadas ao predomínio de células Th2, TGF- β , IL-4 e IL10 (DAYAKAR et al, 2019). E de interleucinas associadas ao controle da LV como IL-12, IL-17, INF- γ e TNF- α que ativam a resposta imune adquirida (SILVA et al, 2022). Porém, alguns outros estudos indicam também que polimorfismos nos genes das interleucinas relacionadas ao sistema imunológico podem influenciar ou modificar essas respostas (MERA-RAMIREZ et al, 2017; SILVA et al, 2022).

A infecção parasitária junto a infecção viral induz ativação imunológica crônica, promovendo aumento da carga de HIV, progressão acelerada para a AIDS e distúrbios imunológicos que propiciam a multiplicação descontrolada do parasita. Os pacientes que apresentam diminuição na contagem de células CD4 + <200

células/mm³, apresentam manifestação clínica da LV observada mais comumente (ALVAR et al, 1997; LINDOSO et al, 2018; SANTOS et al, 2019).

A coinfeção representa um grande desafio em áreas com alta taxa pela interação que existe entre a LV e o HIV. Pessoas infectadas pelo HIV são particularmente vulneráveis a LV, enquanto a LV acelera a replicação e a progressão do HIV para AIDS. Dessa forma, nas áreas de transmissão de HIV, observa-se claramente a sobreposição da LV (LINDOSO et al, 2018).

A principal hipótese do presente estudo é a de que exista diferença significativa na liberação de citocinas entre os grupos coinfectados *Leishmania spp.* e HIV, com os grupos mono infectados pela *Leishmania spp.* Além disso, acredita-se na associação de determinados sinais e sintomas clínicos com os desfechos clínicos apresentados após o tratamento, trazendo diferenças dos escores recomendados pelo Ministério da Saúde (Kalacal).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Leishmaniose Visceral

A leishmaniose Visceral (LV) é uma doença infecciosa, causada pelo protozoário *Leishmania spp.* Em alguns países a doença pode ser causada pela *Leishmania donovani*, e em outros, como no Brasil, o agente infeccioso é a *Leishmania infantum* que apresenta um ciclo zoonótico onde o cão é o principal reservatório. Trata-se de uma patologia que ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais, tipicamente associada a má condição de vida como desnutrição, baixas condições sociais, assim como fatores ambientais como mudanças ambientais e desmatamento (AZEVEDO et al, 2019; WHO, 2021).

Estima-se de 50.000 a 90.000 novos casos ocorram no mundo anualmente, sendo mantida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das principais doenças parasitárias com potencial de surto e mortalidade. Os dados da OMS de 2019 relataram > 90% dos novos casos ocorridos em dez países: Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2022).

Na América latina, houve aumento no número de casos em 2019 na Argentina, Paraguai e Uruguai. O Brasil se mantém entre os países com maiores números de casos das américas, representando 97% dos casos de LV de toda América Latina (OPAS, 2020; WHO, 2021):

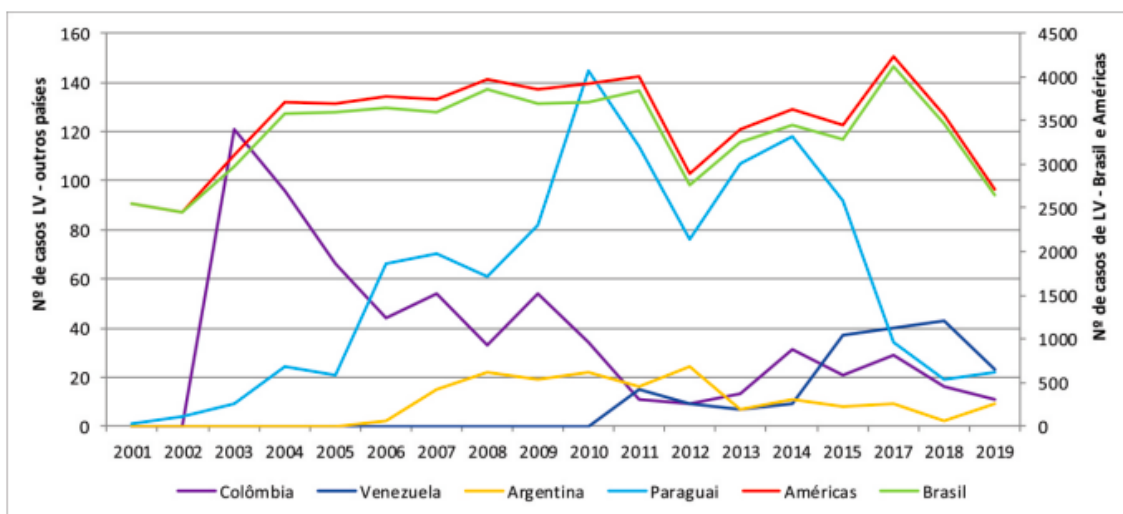


Figura 1. Casos de LV nos países com maior número de casos, Região das Américas, 2001-2019.

Fonte: OPAS (2020).

Entre 2009 e 2019, foram notificados 40.326 casos no Brasil, onde 74,8% deles estão distribuídos por sete estados do país, da maior para a menor incidência: Minas Gerais, Maranhão, Ceará, Pará, Bahia, Tocantins e Piauí). Dentre estes, 5 estados se localizam na região nordeste do país. Para o mesmo período foram registrados 4.115 óbitos pela doença, 53,4% deles também se concentrando nos estados do Nordeste (DATASUS, 2020). No gráfico abaixo, podemos acompanhar os sete estados brasileiros com maior número de casos notificados nos últimos 10 anos:

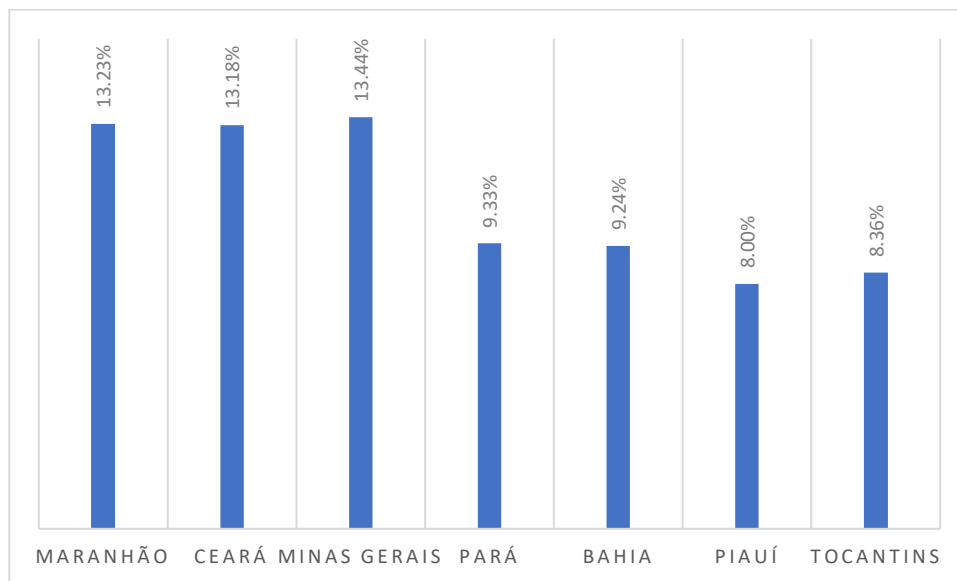


Figura 2. Estados com maior percentual de notificações por LV, Brasil, 2009-2019.

Fonte: BRASIL (2020).

Os protozoários parasitas do gênero *Leishmania* causam um complexo de doenças chamadas leishmanioses. As leishmanioses ocorrem como um espectro de síndromes clínicas que podem ser divididas em leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. A Leishmaniose Visceral (LV) é uma infecção crônica que afeta órgãos internos como o fígado, o baço e a medula óssea. Elas são transmitidas pela picada do flebótomo fêmea infectada da espécie *Lutzomyia*. Durante o seu ciclo de vida, os parasitas de leishmania alternam entre formas amastigotas, que são especializadas para o meio intracelular, se multiplicam nos macrófagos do hospedeiro mamífero, e formas promastigotas, adaptado para a existência extracelular, se multiplicando no hospedeiro, o flebótomo (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVAEZ, 2020).

Os vetores tornam-se infectados quando as fêmeas de flebotomídeos realizam o repasto sanguíneo em mamíferos contaminados, reproduzindo-se e

diferenciando-se em formas promastigotas, que irão se reproduzir e diferenciar-se em formas infectantes, promastigotas metacíclicas. Ao realizar novo repasto em hospedeiro não infectado, o flebotomíneo regurgita formas promastigotas metacíclicas na pele do mamífero. No interior dos macrófagos os promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas e reproduzem-se extensivamente, promovendo a ruptura do macrófago e infecção das células sanguíneas adjacentes. O ciclo continua quando um flebótomo não infectado realiza o repasto sanguíneo novamente em um mamífero contaminado (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVAEZ, 2020).

Inicialmente os parasitas são encontrados principalmente em neutrófilos, onde são capazes de sobreviver, porém, não se diferenciam em amastigotas. Quando a infecção estiver estabelecida, os macrófagos tornam-se a principal célula hospedeira responsável pela eliminação do parasita (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVAEZ, 2020).

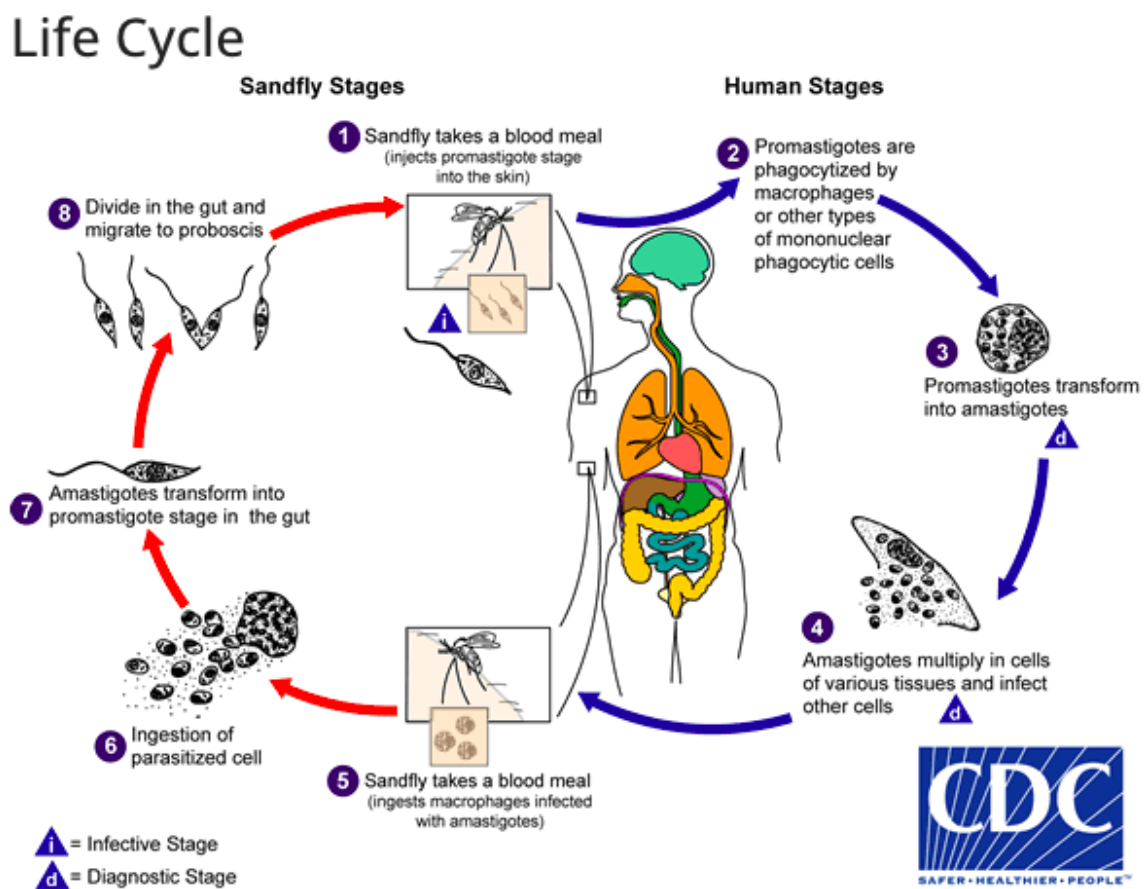


Figura 3. Ciclo evolutivo e epidemiológico da *Leishmania spp.*
Fonte: CDC (2017).

As manifestações clínicas mais comuns da LV são a febre, o emagrecimento, a hepatoesplenomegalia e as alterações hematológicas. Porém, essas manifestações podem variar de acordo com a resposta imune do hospedeiro. No primeiro momento da infecção, a resposta inata é desencadeada para conter sua proliferação. Quando o parasita consegue suprimir mecanismos de defesa importantes como as espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (ROS/ RNS) dentro dos macrófagos, a doença progride (SILVA et al, 2022).

Alguns estudos relatam que a dicotomia Th1/Th2, com diminuição da resposta Th1 e aumento da resposta Th2, desempenham um papel importante no agravamento da infecção. Com desenvolvimento de formas clínicas mais relevantes associados ao predomínio de células Th2, TGF- β , IL-4 e IL10 que prejudicam a atividade antiparasitária dos macrófagos. Assim como as interleucinas associadas ao controle da LV são capazes de ativar a resposta imune adquirida sendo capazes de eliminar os parasitas como IL-12, IL-17, INF- γ e TNF- α (DAYAKAR et al, 2019; SILVA et al, 2022).

Outros estudos indicam que polimorfismos nos genes das interleucinas relacionados ao sistema imunológico podem ser responsáveis pela progressão da doença (MERA-RAMIREZ et al, 2017). Assim como alguns autores indicam ainda que somente um modelo não pode explicar todas as formas de controle das respostas imunes no paciente, podendo haver polimorfismos, imunidade inata e adquirida ou outras citocinas ou associações das respostas envolvidas na patogênese da progressão da LV (SHEHADEH et al, 2019; SILVA et al, 2022).

2.3. HIV

A *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS), ou, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida é a doença provocada pelo vírus do Human Immunodeficiency Virus (HIV). O HIV possui como alvo o sistema imunológico, a medida que o vírus se multiplica, os indivíduos vão se tornando gradualmente imunodeficientes. A transmissão se dá através da troca de fluidos corporais de pessoas infectadas, podendo também ser transmitido de mãe para filho durante a gravidez e parto (WHO, 2021).

O HIV continua a ser um grande problema de saúde pública global, com 37,7 milhões de pessoas com o vírus em todo mundo em 2020, 1,5 milhões de novos infectados e 680.000 óbitos no mesmo ano. No Brasil, as regiões que mais notificaram casos novos no ano de 2019 foram a região Nordeste (35,3% dos casos) e Norte (25,6% dos casos) (BRASIL, 2020; UNAIDS, 2021).

O ciclo de replicação do HIV pode ser dividido em fase inicial e fase tardia. A fase inicial compreende o período desde a ligação do vírus à parede celular até a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira. Essa fase inicia com os vírions maduros do HIV buscando como alvo as células hospedeiras através da ligação direta ao receptor celular CD4+ e aos receptores de quimiocinas (ex. CCR5 e CXCR4). Após a entrada na célula, inicia-se o processo de transcriptase reversa do RNA viral para produção de DNA de fita dupla. A integração viral dentro da célula ocorre com o complexo de pré-integração do HIV transportando o DNA viral para o núcleo, entrando no complexo do poro nuclear, onde ocorre a transcrição do DNA (FREED, 2015; LI; DE CLERCQ, 2016).

A fase tardia contempla os eventos que ocorrerão desde a expressão gênica até a liberação e maturação de novos vírions, incluindo a transcrição de genes virais, exportação dos RNAs virais do núcleo celular para o citoplasma, tradução de RNAs virais para produzir o precursor da poliproteína Gag (Pr55 Gag), o precursor da poliproteína GagPol, as glicoproteínas do envelope viral (glicoproteínas Env) e as proteínas virais reguladoras e acessórias. Ocorre o tráfico dos precursores Gag e GagPol e das glicoproteínas Env para a membrana plasmática, posteriormente, encapsidação do genoma de RNA viral pela montagem da rede Gag, incorporação das glicoproteínas Env virais, brotação dos novos vírions da célula infectada e maturação de partículas. Como uma rota alternativa de brotamento viral, os vírions de HIV nascentes são liberados usando vias de exocitose, iniciando assim um novo ciclo (FREED, 2015; LI; DE CLERCQ, 2016).

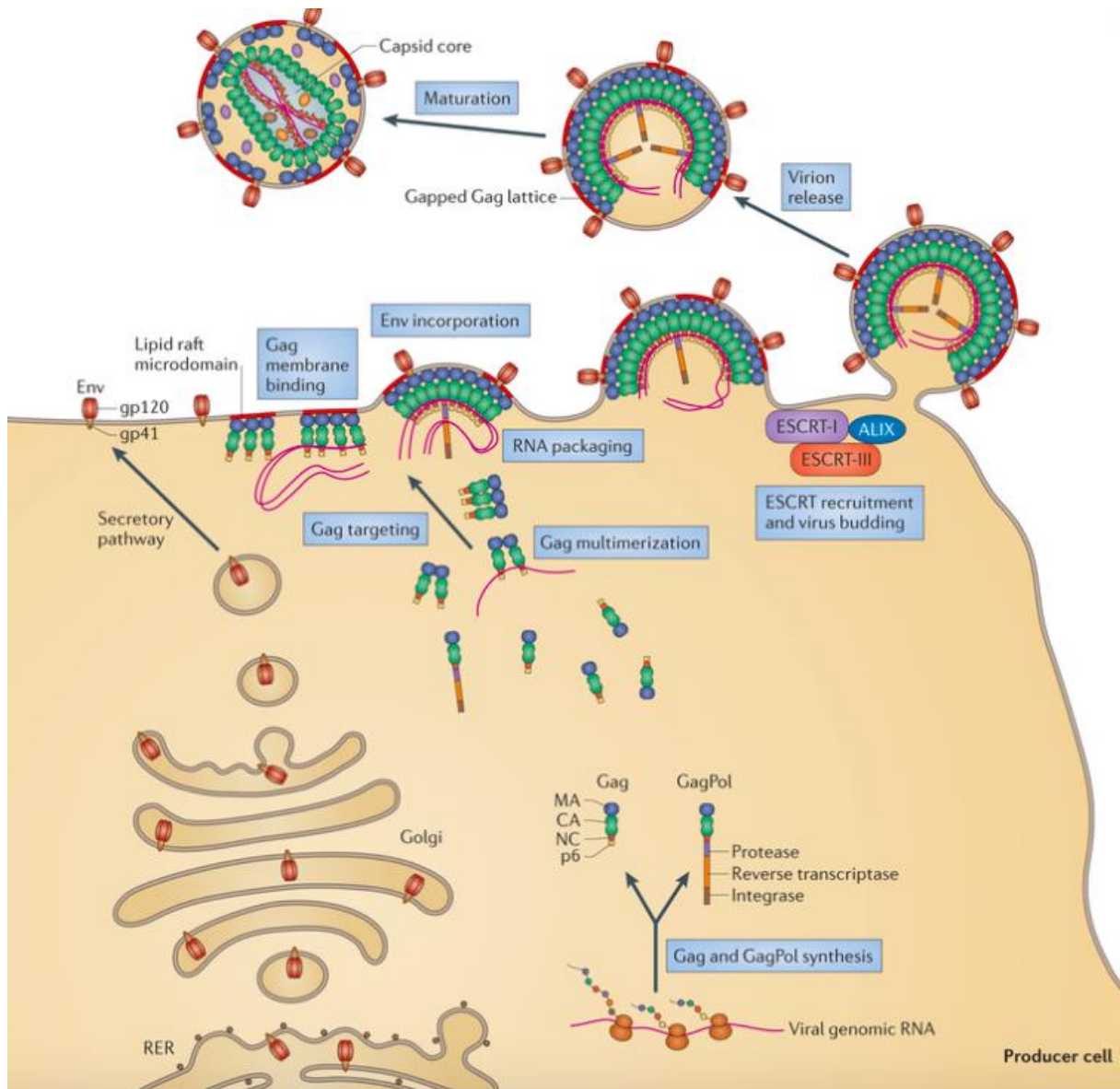


Figura 5. Estágios do ciclo de replicação do HIV
 Fonte: FREED (2015)

A infecção por HIV é caracterizada por altos níveis iniciais de viremia que são controlados de forma variável por respostas das células T CD8+. O comprometimento imunológico causado pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é caracterizado pela perda de células T CD4+. As taxas de complicações associadas ao HIV e morte aumentam à medida que o número dessas células no sangue periférico (contagem de CD4+) diminui. O controle viral pode se dar através da Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), ou, Terapia Altamente Eficaz que é capaz de impedir a replicação viral, diminuindo a carga viral do indivíduo, porém, nem sempre a HAART consegue reverter completamente as deficiências imunológicas que o vírus provoca (LUNGREN et al, 2015; NIESSL et al, 2020).

A HAART é altamente eficaz na manutenção da supressão viral, porém, não promove o aumento da imunidade antiviral do hospedeiro pois acaba limitando a presença do antígeno circulante. Por outro lado, os anticorpos não impedem a replicação viral. Dessa forma, indivíduos infectados pelo HIV e em uso de HAART apresentam níveis estáveis ou decrescentes de respostas de células T CD8+ e CD4+ específicas do HIV ao longo do tempo (NIESSL et al, 2020).

Após a introdução da HAART, ocorreu uma mudança no perfil de morbidade e mortalidade em Pessoas que Vivem com HIV (PVHIV) para causas não relacionadas a AIDS. Embora o aumento da expectativa de vida desses indivíduos possa ter refletido no aumento de doenças como câncer e doenças cardiovasculares, níveis mais elevados de marcadores inflamatórios e de coagulação foram associados a um risco aumentado de mortalidade por todas as causas em PVHIV. Além disso, os marcadores de inflamação sistêmica, como a IL-6 e os marcadores de coagulação, com o Dímero D são mais elevados na infecção pelo HIV (HART et al, 2018; KULLER et al, 2008).

2.4. Coinfecção *Leishmania spp./HIV*

Com a urbanização da LV, saindo das áreas rurais e se espalhando também pelo território urbano, e o avanço do HIV saindo das grandes cidades e se tornando incidente também em áreas rurais, passou-se a ter relatos de casos de coinfecção LV/HIV. Segundo a Organização Mundial de Saúde, as maiores taxas de coinfecção são relatadas no Brasil, na Etiópia na Índia (SOUSA-GOMES, 2017; VIANA, 2017; WHO, 2022).

A infecção pelo HIV tem demonstrado ser fator facilitador para o desenvolvimento da LV, aumentando o risco de infecção por LV de 100 para 2.320 vezes. Entre 2009 e 2019, foram notificados 3.459 casos de leishmaniose em indivíduos infectados pelo HIV no Brasil, o que pode significar cerca de 6% de coinfecção (DATASUS, 2020). Um número pequeno diante da realidade, pois ainda existe um alto índice de casos subnotificados, uma vez que trata-se de uma doença que ocorre em populações negligenciadas e a infecção assintomática é comum em decorrência da imunossupressão que ocorre tanto na infecção pelo HIV, quanto na leishmaniose. As manifestações clínicas dos pacientes coinfectados são semelhantes às dos imunocompetentes, porém, os pacientes portadores de LV/HIV apresentam

risco aumentado de recidiva e também de letalidade (VIANA et al, 2017; SOUSA-GOMES et al, 2017; HENN et al, 2018).

As altas taxas de detecção tanto de LV, quanto de HIV, se concentram em áreas mais pobres do Brasil, como no Norte e Nordeste do país, revelando o caráter socioeconômico das duas infecções. O Maranhão, que se localiza no nordeste brasileiro, ocupou o segundo lugar do país em número de casos da coinfeção LV/HIV no período de 2007 a 2017 (LIMA, 2019; BRASIL, 2020).

Tanto a LV, quanto o HIV possuem uma natureza imunossupressora clara e ambos residem em células hospedeiras semelhantes, como os macrófagos e células dendríticas (CD), fazendo com que esses pacientes possuam efeitos sinérgicos marcantes como uma alta taxa de mortalidade, toxicidade medicamentosa aumentada, de falha no tratamento da LV e maiores chances de recidiva da doença. Existe ainda um risco maior de recidivas nos pacientes portadores da coinfeção mesmo após o alcance da cura, com relatos de cerca de 60 a 70%, sendo ainda esse número mais alto em pessoas com contagem de células CD4+ baixa (DIRO et al, 2018; TAKELE et al, 2022).

As principais manifestações clínicas de pacientes coinfectados LV/HIV é semelhante à observada em pacientes HIV- com LV, geralmente sendo diagnosticados ambos ao mesmo tempo com os sintomas mais prevalentes de febre, tosse, perda de peso, hemorragia, edema, palidez cutânea e hepatoesplenomegalia e esplenomegalia. Com o sintoma de diarreia sendo mais frequente entre os coinfectados (FONTOURA et al, 2018; LINDOSO et al, 2018; SANTOS et al, 2019).

Também foi relatado a presença de quadros clínicos atípicos, diferente dos observados em pacientes portadores de LV sem a infecção pelo HIV como a diarreia. Os distúrbios intestinais podem estar relacionados a utilização concomitante da terapia antiparasitária e a HAART. Além disso, também foi observado fenômenos hemorrágicos em cerca de um terço dos pacientes (LINDOSO et al, 2018).

Em estudo realizado na Etiópia com pacientes coinfectados, houve diferenças entre os grupos monoinfectados pela *Leishmania* spp. para os grupos de coinfectados também com relação a resposta imunológica. Houve produção de IFN- γ mais baixo nos pacientes coinfectados. Os níveis da Proteína C-reativa estavam altos nos dois grupos no momento do diagnóstico e foram diminuindo com o decorrer do tratamento, porém, no grupo de coinfectados, mesmo com a diminuição, os níveis permaneceram significativamente mais elevados. Assim como os níveis de TNF- α , IL-

8 e IL-6 que não diminuíram no grupo dos coinfectados após o início do tratamento (TAKELE et al, 2022).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a associação do desfecho clínico (cura, recidiva e óbito) e o perfil de citocinas apresentado em pacientes coinfectados LV/HIV.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar a frequência dos desfechos cura, recidiva de LV e óbito entre os pacientes coinfectados LV/HIV;
- Identificar as manifestações clínicas e laboratoriais associadas aos desfechos clínicos apresentados na coinfeção;
- Avaliar o perfil de citocinas no pré-tratamento para leishmaniose visceral em pacientes HIV coinfectados LV/HIV;
- Relacionar o perfil de citocinas inflamatórias ao Escore de Gravidade (Kalacal) apresentado pelos pacientes coinfectados LV/HIV;

4. METODOLOGIA

4.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo descritivo e longitudinal, prospectivo, realizado com pacientes em acompanhamento para tratamento de HIV e Leishmaniose Visceral no Hospital de Referência Estadual em Doenças Infecto-Parasitárias na cidade de São Luís-MA, durante o período de janeiro de 2013 a dezembro de 2020.

4.2. Delineamento do estudo

4.2.1. Local do estudo

A presente pesquisa foi realizada em um Hospital de Referência em Doenças Infecto-Parasitárias no Estado do Maranhão que atende a população adulta. A unidade de saúde possui setor de internação, com 36 leitos de enfermaria e 11 leitos de cuidados intensivos (UTI), além de um setor ambulatorial que atende aproximadamente 4.639 pessoas cadastradas vivendo com HIV/AIDS.

4.2.2. População do estudo

Foram incluídos 169 pacientes adultos com idade ≥ 18 anos com infecção pelo HIV confirmada por no mínimo dois testes e diagnóstico de primeiro episódio de LV e que tenham sido tratados no Centro de Referência.

Os critérios de elegibilidade foram: ser maior idade, ter diagnóstico confirmado para Leishmaniose Visceral, infecção por HIV confirmada e esteja em acompanhamento no Centro de Referência.

Critérios de não inclusão foram: diagnóstico de LV sem confirmação laboratorial, prontuários não localizados ou com dados insuficientes. Os critérios de exclusão foram: não aceitação de assinatura de TCLE, descontinuidade de tratamento com perda do prazo para a coleta de sangue para realização dos exames.

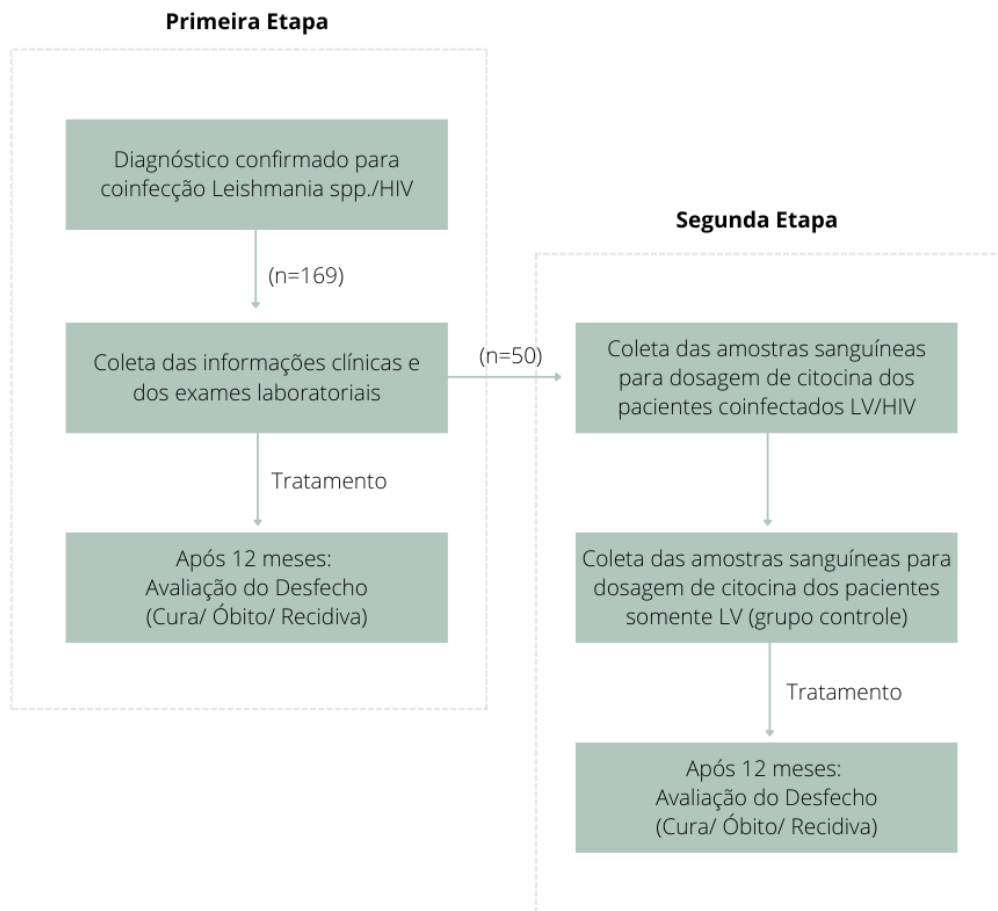
4.2.3. Fluxograma de pesquisa

A primeira etapa da presente pesquisa foi realizada a partir de 2013 com amostra primária, sendo inseridos todos os pacientes que compareceram ao serviço de saúde, que fosse constatado o diagnóstico de coinfeção e que se enquadravam

nos critérios de inclusão já descritos. O recrutamento de pacientes foi realizado até 2018 e a análise dos desfechos até o ano 2020. Totalizando 169 pacientes que foram incluídos no primeiro artigo deste trabalho, intitulado “Factors associated with and hospital death in patients coinfecting with visceral leishmaniasis and HIV”.

Em 2018 foram realizadas coletas de amostras sanguíneas para a realização da dosagem de citocina e execução da segunda etapa da pesquisa. Dessa forma, a primeira etapa totalizou 169 pacientes, dentre estes, 50 foram incluídos na segunda etapa da pesquisa, o que resultou no segundo artigo deste trabalho intitulado “Perfil sérico TH1/TH2/TH17 de citocinas em pacientes coinfectados com LV/HIV em região altamente endêmica”. Segue abaixo fluxograma com as etapas da pesquisa e avaliações que serão realizadas:

Fluxograma 1: Etapas da pesquisa



4.2.4 Investigação clínica

Para o diagnóstico de HIV, foi considerado o teste de ELISA e Teste Rápido, para os pacientes que já tinham diagnóstico e os exames realizados, foram considerados os dados do prontuário. Os pacientes com forte suspeita da coinfeção que estavam em acompanhamento na unidade hospitalar referida foram encaminhados para realização de sorologia através de punção medular (BRASIL, 2006).

O diagnóstico de LV foi confirmado através da presença do exame parasitológico (através da comprovação da presença de parasitas na medula) e do exame sorológico (através da reação de imunofluorescência indireta – RIFI ou o Enzyme-Linked eximmunosorbent Assay - ELISA). O aspirado de medula óssea é considerado um dos métodos que oferece maior sensibilidade no diagnóstico da LV (BRASIL, 2006).

As definições adotadas para cura, recidiva e morte seguiram as diretrizes estipuladas pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2015). A cura foi considerada quando a supressão de parasitas foi mantida por um período superior a 12 meses. A recidiva foi definida como o retorno dos sintomas após a cura clínica. A morte foi definida como morte após a confirmação do diagnóstico LV dos pacientes.

As variáveis de exposição da Leishmaniose Visceral e de gravidade foram baseados nos escores de gravidade propostos no protocolo do Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde (2006) e calculados através do software Kala-Cal (COSTA et al, 2016). O software Kala-Cal foi desenvolvido para estimar a probabilidade de óbito em pacientes com Leishmaniose Visceral de acordo com escores clínicos, sendo capaz de obter uma estimativa quantitativa do prognóstico do paciente.

Para levantamento dos dados clínicos foi utilizada a “Ficha de investigação de óbito de leishmaniose visceral”, que traz como pontos de destaque na avaliação do paciente portador de LV: antecedentes (doença anterior e tratamento utilizado), avaliação física (estado de hidratação, protusão abdominal, hepatoesplenomegalia, edema), terapêutica para HIV e leishmaniose, exames laboratoriais (hemograma completo, AST, ALT, uréia, creatinina, glicemia, contagem de linfócitos TCD4, carga viral, mielograma), evolução (recidiva, óbito e alta hospitalar).

A tabela abaixo descreve as variáveis apresentadas pelo Ministério da Saúde (2014) do Brasil que foram utilizadas na presente pesquisa para avaliação

clínica e avaliação laboratorial de acordo com a evolução clínica da infecção pela LV por período (período inicial, período de estado e período final):

Tabela 1: Comparação da evolução clínica da Leishmaniose Visceral.

	Evolução Clínica		
	Período Inicial	Período de Estado	Período Final
Manifestações Clínicas			
Febre	Presente	Presente	Presente
Emagrecimento	Ausente	Moderado	Acentuado
Palidez	Discreta	Moderada	Acentuada
Hepatomegalia	Discreta	Moderada	Acentuada
Esplenomegalia	Discreta	Moderada	Acentuada
Manifestações hemorrágicas	Ausente	Incomum	Frequente
Laboratório complementar			
Anemia	Discreta	Moderada	Acentuada
Leucopenia com neutropenia	Ausente	Presente	Acentuada
Plaquetopenia	Ausente	Presente	Acentuada
Hiperglobulinemia	Discreta	Elevada	Elevada

Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2014.** Brasília. 1 ed. 5ª reimpressão.

*Forma Oligossintomática – Manifestações clínicas semelhantes ao período inicial, de curta duração e sem alterações laboratoriais (exceto VHS alto e hiperglobulinemia).

Considerou-se febre presente aquela a qual a aferição da temperatura se deu por termômetro com indicação acima de 37,6°C. A esplenomegalia foi avaliada através da palpação do fígado e mensuração da distancia, foi considerado uma hepatomegalia discreta aquela em que o fígado ultrapassa levemente a reborda costal no final da inspiração (até dois dedos transversais), foi considerado uma hepatomegalia moderada quando o fígado apresentou cerca de quatro dedos de distanciamento da reborda costal e hepatomegalia acentuada quando o fígado se encontra a mais de quatro dedos de distancia e pode alcançar a cicatriz umbilical ou o quadrante inferior direito (PORTO, 2008).

O baço foi avaliado através da técnica de palpação e percussão, foi considerada esplenomegalia discreta aquela palpável apenas com técnica especial e acentuada quando causa o abaulamento do flanco, sendo confirmada pelo hemograma através da anemia, leucopenia e trombocitopenia. Para qualificação da palidez, examinou-se a coloração das mucosas através de uma avaliação quantitativa usando-se a escala de 1 a 4 cruzes onde + significam uma palidez leve ou discreta, ++ e +++, uma palidez moderada e ++++ uma palidez acentuada (PORTO, 2008)

A tabela abaixo descreve as variáveis apresentadas pelo Ministério da Saúde (2014) do Brasil que foram utilizadas na presente pesquisa para avaliar o prognóstico de óbito na amostra estudada:

Tabela 2: Modelos de prognóstico construídos pela adição de variáveis clínicas e variáveis clínicas e laboratoriais, ponderadas pela força da associação estatística para a morte em pacientes com mais de 2 anos de idade diagnosticados com Leishmaniose Visceral.

Variável	Peso da variável no modelo clínico	Peso da variável no modelo clínico e laboratorial
Idade		
2-20 anos	-	-
20-40 anos	1	1
>40 anos	2	2
Sangramento		
1-2 sítios	1	1
3-4 sítios	2	2
5-6 sítios	3	3
AIDS	2	3
Edema	1	1
Icterícia	1	1
Dispneia	1	1
Infecção bacteriana	1	1
Leucócitos < 1.500/mm³	-	2
Plaquetas < 50.000/mm³	-	3
*Insuficiência renal	-	3
Pontuação máxima	11	20

Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2014.** Brasília. 1 ed. 5ª reimpressão.

*Baixa de filtração glomerular abaixo de 60ml/min/mm² ou creatinina sérica acima dos níveis superiores para a idade.

4.2.5 Avaliação das citocinas

Após a coleta das amostras sanguíneas para a realização da análise das citocinas inflamatórias foi realizado em 50 pacientes, divididos entre pacientes com LV e pacientes coinfetados LV/HIV. Foram separados 5ml de sangue para centrifugação e separação do plasma. O soro foi separado em alíquotas para a avaliação do perfil de citocinas. A quantificação das citocinas aconteceu por citometria de fluxo. As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-17 foram quantificadas por kit de citocinas *Cytometric Bead Array* (CBA) Human Th1/Th2/Th17, de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences). Os resultados foram adquiridos por citometria de fluxo com FACScalibur (BD) e analisados utilizando-se o software FCAP (BD).

Os resultados foram tabelados e analisados para a obtenção de um perfil de citocinas e, posteriormente, comparados aos dados clínicos dos participantes da pesquisa. Sendo avaliado através do exame físico e exames disponíveis no prontuário.

4.2.6 Análise Estatística

A análise estatística foi executada respeitando os pressupostos determinados nos resultados, as características e o comportamento das variáveis do estudo. Os dados foram processados utilizando os recursos do software SPSS versão 18.0 (IBM, Chicago, IL, USA). A estatística descritiva foi realizada através do cálculo de medidas de frequência, média e desvio-padrão. A distribuição das variáveis categóricas entre os grupos foi avaliada através dos testes Qui-quadrado (χ^2) ou Exato de Fisher.

A normalidade das variáveis quantitativas foi aferida através do teste Lilliefors. Após este procedimento, o teste T de Student pareado foi utilizado para comparar o ano de diagnóstico da LV e HIV no grupo de pacientes co-infetados. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%.

4.2.7 Comitê de ética

A presente pesquisa foi registrada na Plataforma Brasil, recebendo parecer favorável do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário do Maranhão (HUUFMA parecer número: 409.351). Os pacientes do estudo prospectivo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Embora os casos retrospectivos tenham sido dispensados dessa exigência pelo comitê de ética, seu anonimato foi garantido desde o momento da coleta de dados até a finalização da pesquisa. A autorização também foi obtida da Coordenação de Estadiamento e Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde do Maranhão.

REFERÊNCIAS

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; GUTIÉRREZ-SOLAR, B.; JIMÉNEZ, M.; LAGUNA, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MORENO, J. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin Microbiol Rev.** 1997.

ANTONELLI L.R.; DUTRA, W.O.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K.J. Antigen-specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggest mechanisms for immunoregulation. **Clin Exp Immunol** . v.136, n.2, p.341-348, 2004.

BACELLAR, O.; BRODSKYN, C.; GUERREIRO, J. et al. Interleukin 12 restores IFN-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **J Infect Dis.** 1996.

BALAGOPAL A; RAY, S.C.; DE OCA, R.M.; SUTCLIFFE, C.G.; VIVEKANANDAN, P. et al. Kupffer cells are depleted with HIV immunodeficiency and partially recovered with antiretroviral immune reconstitution. **AIDS**, v.23, p.2397–2404, 2009.

BARBOSA JÚNIOR, W. L; JUSTO, A. M.; SANTOS; A. M. A.; LORENA, V.M.B.; CARMO, R.F do; MELO, F.L de; MEDEIROS, Z.M de; VASCONCELOS, L.R.S. Higher levels of TNF and IL-4 cytokines and low miR-182 expression in visceral leishmaniasis-HIV co-infected patients. **Parasite Immunology**. v.42, 2020.

BENTWICH, Z. Concurrent infections that rise the HIV viral load. **J. HIV Ther.** v.8, p.72-75, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. **Informações de Saúde (TABNET): Epidemiológicas e Morbidade**. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico de HIV e AIDS. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R.L.; REED, S.G. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J Immunol**, v.152, n.12, p.5949-56, 1994.

CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D. et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. **J Infect Dis.** 1992.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> Acesso em 30 de outubro de 2022.

COSTA, D.L.; ROCHA, R.L.; CHAVES, E.B.; BATISTA, V.G.; COSTA, H.L.; COSTA, C.H. Predicting death from kala-azar: construction, development, and

validation of a score set and accompanying software. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.9, n.6, 2016.

COTA, G.F.; DE SOUSA, M.R.; DE MENDONÇA, A.L.P.; PATROCÍNIO, A.; ASSUNÇÃO, L.S.; DE FARIA, S.R. et al. *Leishmania*-HIV Co-infection: Clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v.8, n.4, 2014.

DATASUS. tabnet.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>. Acesso em fev.2020.

DAYAKAR, A.; CHANDRASEKARAN, S.; KUCHIPUDI, S.V.; KALANGI, S.K. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. **Frente. Immunol.** 2019.

D'ETTORRE, G.; CECCARELLI, G.; CARNEVALINI, M.; FORCINA, G.; ZAFFIRI, L.; MASSETTI, A.P.; MASTROIANNI, C.M.; VULLO, V. Central role of interleukin-15 in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients with visceral leishmaniasis. **Acta Trop.** v.99, n.1, p.83-7, 2006.

DIRO, E.; RITMEIJER, K.; BOELAERT, M. et al. Long-term clinical outcomes in visceral leishmaniasis/human immunodeficiency virus co-infected patients during and after secondary prophylaxis with pentamidine in Ethiopia: a single arm clinical trial. **Clin Infect Dis.** v.66, n.3, p.444-451, 2018.

ECHCHAKERY, M.; NIETO, J.; BOUSSAA, S.; et al. Asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients in Morocco. **Parasitol Res.** 2018.

FREED, E.O. "Montagem, liberação e maturação do HIV-1." Revisões da natureza. **Microbiologia** v. 13, n.8, 2015.

HART, B.B.; NORDELL, A.D.; OKULICZ, J.F. et al. Inflammation-related morbidity and mortality among HIV-positive adults: how extensive is it ? **J Acquir Immune Defic Syndr**, v.77, n.1, p.1-7, 2018.

KULLER, L.H.; TRACY, R.; BELLOSO, W. et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. **PLoS Med.** v.5, n.10, p.e203, 2008.

KEMP, K. Cytokine-producing T cell subsets in human leishmaniasis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v.48, n.3, p.173-6, 2000.

LI, G; DE CLERCQ, E. HIV Genome-Wide Protein Associations: uma revisão de 30 anos de pesquisa. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2016.

- LIMA, I.P.; MÜLLER, M.C.; HOLANDA, T.A. et al. Human immunodeficiency virus/*Leishmania infantum* in the first foci of urban American visceral leishmaniasis: clinical presentation from 1994 to 2010. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.46, n.2, p.156–160, 2013.
- LIMA, U.R.; VANOLLI, L., MORAES, E.C.; ITHAMAR, J.S.; AZEVEDO, C.M.P.E.S. Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil: What is the impact of HIV on this protozoan infection? **PLoS One**. 2019.
- LINDOSO, J.A.L.; MOREIRA, C.H.V.; CUNHA, M.A.; QUEIROZ, I.T. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. **HIV AIDS (Auckl)**. 2018.
- LORÍA-CERVERA, E.N.; ANDRADE-NARVAEZ, F. The role of monocytes/macrophages in *Leishmania* infection: A glance at the human response. **Acta Tropica**, 2020.
- LUNDGREN, J. et al. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. **The Journal New England Journal of Medicine**. v.373, n.9, 2015.
- MERA-RAMÍREZ, A.; CASTILLO, A.; OROBIO, Y.; GÓMEZ, M.A.; GALLEGOMARIN, C. Screening of TNF α , IL-10 and TLR4 single nucleotide polymorphisms in individuals with asymptomatic and chronic cutaneous leishmaniasis in Colombia: a pilot study. **BMC Infect. Des**. v.17, n.177, 2017.
- NISSL, J.; BAXTER, A.E.; MENDOZA, P. et al. Combination anti-HIV-1 antibody therapy is associated with increased virus-specific T-cell immunity. **Nat Med**. v.26, n.2, p.222-227, 2020.
- NIGRO, L.; CACOPARDO, B.; PREISER, W.; BRANER, J.; CINATL, J.; PALERMO, F.; RUSSO, R.; DOERR, H.W.; NUNNARI, A. In vitro production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from subjects coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania infantum*. **Am J Trop Med Hyg**. v.60, n.1, p.142-5, 1999.
- OLIVIER, M.; GREGORY, D.J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.2, 2020.
- OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde. **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas**. nº9, 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-dezembro-2020-0>
- OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. **Immunologic Research**. v.56, p.163-171, 2013.
- PRAISER W.; CACOPRADO, B.; NIGRO, L.; BRANER, J.; NUNNARI, A.; DOERR, H.W.; WEBER, B. Immunological findings in HIV-*Leishmania* coinfection. *Intervirology*, v.39, n.4, 1996.

SANTOS, G.O.; et al. Prevalence of HIV and associated factors among visceral leishmaniasis cases in an endemic area of Northeast Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [Internet]. 2019.

SHEHADEH, F.V.B et al. TGF- β 1 polymorphism in American tegumentary leishmaniasis in a Southern Brazilian population. *Rev. Soc. Sutiãs. Med. Tropa*, v.52, n.3, 2019.

SILVA, R.R; VASCONCELOS, F.S.F.; TAVARES, D.D.S; SANTOS, P.L. Association between interleukin 10 (IL-10) polymorphisms and leishmaniasis progression: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep.** v.12, n.1, 2022.

TRINCHIERI, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). **Curr Opin Immunol**, 1997.

TUYAMA, A.C.; HONG, F.; SAIMAN, Y.; WANG, C.; OZKOK, D. et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-1 infects human hepatic stellate cells and promotes collagen I and monocyte chemoattractant protein-1 expression: implications for the pathogenesis of HIV/hepatitis C virus-induced liver fibrosis. **Hepatology**, v.52, p.612–622, 2010.

UNAIDS. **UNAIDS Data 2020**. 2^a ed, 2020. Available from: <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/data-and-trends/global-statistics>

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**, Ed. Atheneu, 2015.

WHO. World Health Organization. **HIV/AIDS. 2021**. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2022. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

5. RESULTADOS

5.1 Factors associated with relapse and hospital death in patients coinfectd with visceral leishmaniasis/HIV

Artigo científico submetido a revista BMC Infection Disease. O periódico selecionado possui Estrato A3, na sua classificação atualizada na WEBQUALIS da CAPES, na área de avaliação MEDICINA I (Print ISSN: 1471-2334).

Fator de impacto: JCR 3.714

Larissa Di Leo Nogueira Costa¹

Uiara Silva Lima²

Vandilson Pinheiro Rodrigues³

Mayara Ingrid Sousa Lima⁴

Lucilene Amorim Silva⁵

Jorim Ithamar⁶

Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo⁷

- 1- University of Maranhão (UFMA); Nurse Infectologist. PhD student in Health Sciences at the Federal University of Maranhão (UFMA), Master in Nursing from UFMA, Specialist in Infectious Diseases Nursing from the Federal University of São Paulo (UNIFESP), Professor at the Department of Nursing, UFMA/Pinheiro. São Luís, Maranhão, Brazil. E-mail: nogueira.larissa@ufma.br (corresponding author).
- 2- University of Maranhão (UFMA); Nurse Infectologist. MSc in Health Sciences from UFMA, Specialist in Infectious Diseases Nursing from UNIFESP. São Luís, Maranhão, Brazil. E-mail: uiarasilva07@gmail.com
- 3- University of Maranhão (UFMA); PhD in Dentistry, UFMA. Professor of the Post-Graduation Program of UFMA. São Luís, Maranhão, Brazil. E-mail: vandilson.rodrigues@ufma.br
- 4- University of Maranhão (UFMA); PhD in Genetics and Biochemistry from the Federal University of Uberlândia. Full Professor at UFMA. São Luís, Maranhão, Brazil. E-mail: mayara.ingrid@ufma.br
- 5- University of Maranhão (UFMA); PhD in Experimental Pathology from Fiocruz Salvador/Bahia. Adjunct Professor, Department of Pathology, UFMA. São Luís, Maranhão, Brazil. E-mail: lucilene.silva@ufma.br
- 6- Hospital Presidente Vargas; Clinical and Sanitarian Physician at Hospital Presidente Vargas. São Luís, Maranhão, Brazil. E-mail: js.ithamar@bol.com.br

7- University of Maranhão (UFMA); Infectologist. PhD in Biological Sciences from the Federal University of Minas Gerais (UFMG). Master's degree in Health and Environment from UFMA. Associate Professor at UFMA. São Luís, Maranhão, Brazil. E-mail: conceicao.pedrozo@ufma.br

Keywords: visceral leishmaniasis; HIV; recurrence; death; Brazil.

Running title: Outcomes in Visceral Leishmaniasis/HIV

Summary: Visceral leishmaniasis/HIV patients with splenomegaly and adenomegaly had increased odds of relapse, and weight loss and edema had increased odds of death. Higher urea and creatinine were associated with relapse, and lower hematocrit, hemoglobin and platelets were associated with death.

Abstract

Objective: Visceral leishmaniasis (VL) is an endemic parasitic disease in Latin America, and its clinical picture is aggravated in coinfections with the human immunodeficiency virus (HIV).

The objective of this study was to investigate clinical factors and laboratory variables associated with VL relapse and death in VL/HIV coinfecting patients.

Methods: A prospective longitudinal study was conducted from January 2013 to July 2020 among 169 patients coinfecting with VL and HIV. The outcomes investigated were the occurrence of VL relapse and death. Chi-square test, Mann-Whitney test and logistic regression models were used for statistical analysis.

Results: The occurrence rates were 41.4% for VL relapse and 11.2% for death. Splenomegaly and adenomegaly were associated with the increased risk of VL relapse. Patients with VL relapse had higher levels of urea ($p = .005$) and creatinine ($p < .001$). Patients who died had lower red blood cell counts ($p = .012$), hemoglobin ($p = .017$) and platelets ($p < .001$). The adjusted model showed that antiretroviral therapy for more than 6 months was associated with a decrease in VL relapse, and adenomegaly was associated with an increase in VL relapse. In

addition, edema, dehydration, poor general health status, and paleness were associated with an increase in hospital death.

Conclusion: The findings suggest that adenomegaly, antiretroviral therapy, and renal abnormalities can be associated with VL relapse, while hematological abnormalities, and clinical manifestations like paleness, and edema can be associated with an increased odds of hospital death.

Trial registration: The study was submitted to the Ethics and Research Committee of the Federal University of Maranhão (Protocol: 409.351).

Keywords: Visceral Leishmaniasis; HIV; Recurrence; Death; Brazil.

INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* [1]. It occurs mainly in tropical and subtropical areas, with higher rates in populations that are in situations of social vulnerability. In Latin America, 97% of VL cases occurred in Brazil in 2019. Between 2009 and 2019, 40,326 cases were reported in Brazil, 74.8% of them were distributed in seven states of the country (Minas Gerais, Maranhão, Ceará, Pará, Bahia, Tocantins and PiauÍ), and five of them are located in the northeastern region of this country [2, 3].

VL cases are becoming urbanized as people leave rural areas. Meanwhile, other diseases such as the Human Immunodeficiency Virus (HIV) are advancing, as they are leaving large cities and also becoming incident in rural areas. Therefore, reports of cases of VL/HIV coinfection are starting to emerge [4, 5]. Between the years of 2009 and 2019, 3,459 cases of leishmaniasis were reported in HIV-infected individuals in Brazil, which may mean a coinfection rate of about 6% [3, 6, 7]. Maranhão state, which is located in northeastern Brazil,

ranked second in the country in the number of cases of VL/HIV coinfection from 2007 to 2017 and accounted for 11.9% and 11% of the country's cases, respectively [3, 4].

VL/HIV coinfection induces an increase in the lethality rate and an increase in the number of visceral leishmaniasis relapses, in proportions of approximately threefold and fivefold respectively, compared with HIV-negative groups. In addition, it favors the appearance of unusual clinical manifestations [5]. Some evidences have shown that coinfecting patients develop a chronic immune activation, with reduced responses to therapy, presenting higher frequencies of clinical manifestation, higher chances of relapse, and mortality [4].

In this context, understanding the clinical features and serum markers associated with VL relapses and deaths in VL/HIV coinfection may help to identify patients more susceptible to adverse outcomes and guide therapy and monitoring. Therefore, the present study aimed to investigate predictive factors for VL relapse and hospital death among patients coinfecting with VL/HIV.

METHODS

Study design and sample selection

A prospective longitudinal study was conducted with the coinfecting patients who were admitted from the year 2013 to 2019 in the hospital unit where the research was conducted. These patients were treated for the coinfection, being reassessed after 12 months for analysis of the outcome. Clinical evaluation was performed along with the search for laboratory information in the medical record. It should be noted that from the year 2020 to 2022, due to the pandemic situation, it was not possible to continue the study. The present study was conducted in a reference hospital for the treatment of infectious-parasitic diseases in the city of São Luís, state of Maranhão, Brazil. The present study was approved by the Research Ethics Committee of the University Hospital of Maranhão.

The study sample included 169 patients of both sexes, older than 18 years of age, who were serologically positive for HIV and had a parasitological diagnosis of VL, determined from bone marrow aspirates, according to Brazilian Ministry of Health guidance [8, 9]. These patients were treated for coinfection in the referral hospital. The exclusion criteria were the lack of follow-up treatment at the hospital and incompleteness of laboratory records [3].

Data collection

Clinical and laboratory data were collected at the time of admission of the patient with a confirmed diagnosis of HIV and strong suspicion of VL. The outcomes investigated in this study were VL relapse and death during treatment follow-up. The definitions adopted for cure, relapse, and death followed the guidelines stipulated by the Brazilian Ministry of Health. Clinical recovery was considered when parasite suppression was maintained for a period longer than 12 months. Relapse was defined as the return of symptoms after clinical recovery. Death was defined as death after confirmation of the VL diagnosis of the patients [5]. All patients were followed up for at least 12 months after treatment for the coinfection.

Exposure and severity (KalaCal) variables [10] were collected based on the "visceral leishmaniasis death investigation form", which is an instrument used by the Brazilian Ministry of Health for VL surveillance and control actions [9]. Data included VL history (previous disease and treatment used), physical assessment (hydration status, abdominal protrusion, hepatosplenomegaly, and edema), HIV and leishmaniasis therapy, laboratory tests (complete blood count, AST, ALT, urea, creatinine, glycemia, CD4 T lymphocyte count, viral load and myelogram) and evolution (relapse, death or hospital discharge).

The presence of hepatomegaly was evaluated by palpating the liver and measuring its size using the Adams Classification. The occurrences of hepatomegaly were considered mild if

the liver length exceeded 1 to 2 cm, were considered moderate if there was a 3 to 7 cm increase, and were considered as major increase if the liver length was greater than 7 cm increase [11].

The spleen was evaluated by palpation and percussion. The occurrences of splenomegaly were considered when the spleen was palpable or with the presence of flank bulging. Changes in the spleen were considered grade I (spleen palpable only below the costal margin), grade II (spleen palpable between the costal margin and a line across the umbilical scar), and grade III (spleen palpable below the umbilical scar). To qualify the state of pallor, the color of the mucous membranes was examined through quantitative evaluation using a scale from 1 to 4, such that + represented mild or discrete pallor; ++ and +++, moderate pallor; and ++++ severe pallor [11].

Clinical and laboratory scores were calculated by adding up the scores obtained for the presence of clinical and laboratory findings (Table 1). For this, age from 20 to 40 years was considered as 1 point and over 40 years 02 points in the severity score. The presence of bleeding was also considered with 1 point for bleeding in up to two different sites, 2 points for bleeding from three to four sites, and 3 points in cases where there was bleeding in more than five sites. The signs of edema, jaundice, dyspnea and bacterial infection were scored as 1 point for each sign present. Leukopenia was scored as 2 points and the presence of AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome), thrombocytopenia, and renal insufficiency as 03 points each. Patients with a score greater than or equal to six, in clinical and laboratory criteria, are those who are at increased risk of progressing to death. These scores are used to monitor the health status of VL patients in Brazil [12].

Statistical analysis

The data analysis was performed using STATA version 16 (Stata Corp., College Station, TX, USA) and GraphPad Prism version 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego,

USA). The frequencies of categorical variables were compared using the chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. Continuous data were analyzed using the Mann-Whitney U test. Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated to investigate associations of signs and symptoms with outcomes.

Multiple logistic regression analysis was performed to estimate adjusted odds ratios and 95% confidence intervals. The dependent variables were VL relapse (Model 1) and hospital death (Model 2). The independent variables included in logistic model 1 were age, sex, duration of antiretroviral use, splenomegaly, and adenomegaly. The independent variables included in the logistic model 2 were age, sex, duration of antiretroviral use, emaciation, edema, dehydration, general status, and paleness. The significance level adopted was 5%.

RESULTS

The Data on the general characterization of the sample are presented in Table 2. Most of the coinfecting patients were male (89.3%). We observed that 41.4% had VL relapse and 11.2.% died during follow-up. The most frequent age group was 30 to 39 years (40.2%) and the majority self-reported their skin color as brown (68.1%). Regarding VL treatment, it was observed that liposomal amphotericin B was the medication most used (72.8%), the most frequent duration of medication use was up to 10 days (78.7%).

Regarding antiretroviral therapy, most of the patients was under treatment with lamivudine, tenofovir and efavirenz (46.2%) or lamivudine, tenofovir and lopinavir/ritonavir (33.1%) schemes. It was noticed that 72.8% of the sample were under antiretroviral therapy in the period up to 6 months. Association analysis showed that the patients on the lamivudine, didanosine and lopinavir/ritonavir regimen had higher relapse frequency ($P = .007$). The patients on antiretroviral therapy for up to 6 months had higher relapse frequency ($P < .001$).

In addition, VL relapse was higher in patients who had previous relapse episodes (95.3% *versus* 8.6%, $P < .001$).

Table 3 presents the association analysis on VL signs and symptoms in relation to occurrences of relapse and death. These data were measured at the time of patient admission. Splenomegaly (OR = 2.20; 95% CI = 1.13–4.37) and adenomegaly (OR = 3.11; 95% CI = 1.02–10.52) were associated with a greater chance of VL relapse. Detection of weight loss (OR = 3.83; 95% CI = 1.15–17.11) and edema (OR = 4.05; 95% CI = 1.13–13.17) on physical examination were associated with the occurrence of death.

Figure 1 shows the evaluation of dehydration, general condition and mucosal pallor according to the outcomes of relapse and death. No associations between these variables and VL relapse were observed. On the other hand, we noticed higher frequencies of dehydration, poor general health status and mucosal pallor among patients who had died by the time of the follow-up.

Table 4 presents the serum markers that showed associations with VL relapse. Patients with relapse had statistically higher levels of urea ($p = .005$) and creatinine ($p < .001$). Patients who died had statistically lower counts for red blood cells ($p = .012$), hemoglobin ($p = .017$) and platelets ($p < .001$).

Figure 2 shows that CD4 T-lymphocyte level, viral load, clinical score and laboratory score according to the outcome did not present any association with relapse and death. Clinical and laboratory scores were not significantly associated with relapse. On the other hand, clinical scores ($p = .001$) and laboratory scores ($p < .001$) were statistically significantly higher among patients who died.

The multiple logistic regression analysis is shown in Table 5. Antiretroviral therapy more than 6 months was associated with a decrease in VL relapse (adjusted OR = .10, 95% CI = .03–.31, $p < .001$). Adenomegaly was associated with an increase in VL relapse (adjusted OR

= 4.65, 95% CI = 1.11-19.45, $p = .035$). In model 2, edema (adjusted OR = 12.36, 95% CI = 2.59-58.78, $p = .001$), dehydration (6.36, 95% CI = 1.51-26.69, $p = .011$), poor general health status (adjusted OR = 33.08, 95% CI = 4.46-245, $p < .001$), and paleness (adjusted OR = 4.78, 95% CI = 1.12-20.39, $p = .034$) were associated with an increase in hospital death.

DISCUSSION

The main findings from the present study indicated that the percentage of VL relapse was 41.4% among VL/HIV coinfecting patients in this city in northeastern Brazil. In a study conducted in the state of Ceará, Brazil, 29% of coinfecting patients had an unfavorable outcome, which was recurrence in 21.4% [13]. A study found that the propensity to adverse events and death was three times higher among coinfecting patients than among HIV-negative patients [14]. According to Lindoso et al [15], patients coinfecting with VL/HIV were at increased risk of relapse and lethality, which was clearly determined by the preponderance of the immune response, and mainly by the CD4+ T lymphocyte count. It is important to notice that Maranhão, the state where the present study was conducted, is the second state in Brazil with the highest percentage of VL patients [2, 3].

The data from the present study showed that there were higher frequencies of coinfecting men and individuals in the age group of 30 to 39 years. These results were in agreement with other data in the literature, which may reflect the fact that HIV and leishmaniasis are proportionally more prevalent among the male population than in the general population [16].

A study has shown that male sex was a potential risk factor for seroprevalence, seroconversion and incidence [17]. This strongly suggested that biological factors such as the role of hormones in modulating the immune system may be related to sex in the pathogenesis of leishmaniasis. Evidence has shown that testosterone was associated with increase *L.*

donovani uptake by macrophages, thereby increasing the infection rates and levels of these cells in vitro, which suggested that this hormone had a direct influence on increasing the level of infected cells [17]. Other studies indicate that there are no definitive conclusions about the reasons for the disparity between the sexes, and that this difference between men and women may be associated with reasons other than hormonal factors, such as the exclusion of some groups that may affect the results, for example, pregnant women [18].

Regarding VL treatment, it was observed in the present study that liposomal amphotericin B was the most prescribed drug therapy (72.8%), which is in line with the guidelines of the World Health Organization [19, 20] and the Brazilian Ministry of Health [9], which recommends amphotericin B as the first-choice therapy for VL/HIV coinfecting patients. This drug can be used in liposomal form or as amphotericin B deoxycholate. Liposomal amphotericin B is the main drug used worldwide, because of its better outcomes. It is the most potent leishmanicidal agent that is commercially available, and it also has the advantage of low toxicity, compared with conventional amphotericin B [15].

In this study, liposomal amphotericin B was the drug that had the highest number of relapses and deaths. Studies show that liposomal amphotericin B has some side effects, including decreased potassium and transient changes in creatinine levels [21]. In Brazil, it is the most widely used drug because it is the drug of the first choice indicated and made available by the country's health system [9]. Thus, more studies would be needed to know if there is a correlation between the number of relapses and deaths and the drug used [21].

Most of the sample was receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) consisting of a regimen of either lamivudine + tenofovir + efavirenz (3TC+TDF+EFZ) (46.2%) or lamivudine + tenofovir + lopinavir/ritonavir (3TC+TDF+LPV/RTV) (33.1%), and it was noticed that 72.8% had only started the therapy within the last six months. In this study, patients on antiretroviral therapy for up to six months had statistically higher relapse frequency. This

may be explained by the lack of complete recovery of CD4⁺ counts in these individuals. Even after antiretroviral therapy has been started, a certain degree of stabilization is still required for the immune system to be able to respond adequately again [22]. Davi-Mendez et al [22] stated that a CD4/CD8 ratio < 1 was associated with biomarkers of activation and inflammation, and was predictive of morbidity and even mortality due to non-AIDS-related causes. In their study, the average time taken for normalization of the CD4/CD8 ratio was six months. One year of starting the therapeutic scheme, 62% of patients had recovered, while 38% still had abnormal CD4⁺ levels. Thus, VL/HIV coinfecting patients with only up to six months of antiretroviral therapy may be more susceptible to relapse episodes.

Parasitic infection together with viral infection induces chronic immune activation, which promotes increased HIV load, accelerated progression to AIDS and presence of immunological disturbances that propitiate uncontrolled parasite multiplication. Patients with decreased CD4⁺ cell counts (< 200 cells/mm³) have higher frequency of VL clinical manifestations [14, 15, 23].

It was observed that 11.2% of the patients died during the follow-up of this study. This proportion was considered low in comparison with the mortality rates among coinfecting patients described in other studies. It more closely resembled the mortality rates of HIV-positive people without coinfection [24]. However, the present study provided the first description of the hospital death rate among VL/HIV coinfecting patients, which may serve as an explanation for the differences in the numbers found.

Santos et al [14] found a mortality rate of 24.3%, a rate similar to that found by Sousa-Gomes et al [6] (23.2%). Both of these studies were conducted using database records available from the Brazilian Ministry of Health. Guedes et al [16], in a study conducted in Pernambuco (northeastern Brazil), found a mortality rate of 14.3%, and Távora et al [13] obtained a rate of 7.14%.

Some statistically significant associations were observed with regard to the physical examination variables. Splenomegaly and adenomegaly were associated with a greater chance of VL relapse. Hurissa et al [25] studied 92 coinfecting patients; in their results, all patients presented splenomegaly and generalized weakness. In a study by Mohammed et al [26] among groups of VL/HIV coinfecting patients who presented repeated relapses, the frequency of spleen enlargement was 98%, which may indicate a form of primary host immune deficit leading to multiple relapses.

Detection of weight loss and edema in the physical examination was associated with occurrence of death. Although some studies have shown an atypical clinical manifestation in coinfecting patients, other studies corroborate the present study through showing classic symptoms such as fever, weight loss and splenomegaly [23, 27]. On the other hand, we noted that the frequencies of greater-impairment categories of these variables were higher among patients who had died by the time of the follow-up of the study.

In addition, present data showed that previous episodes of VL relapse were associated with new relapse. This finding can be supported by some studies that have suggested that Th2-mediated immune disorders could affect later infection control [29,30].

In the present study, patients with relapsing VL had statistically significantly higher levels of urea and creatinine. Other authors have also found abnormal creatinine levels in their studies with VL/HIV coinfecting patients [13, 28]. The probable explanation for this is that the associations of drugs that are used to treat HIV and related infections are responsible for a substantial proportion of the renal abnormalities developed in this group of patients. Both HAART and conventional amphotericin B have extensive renal toxicity, which leads to several serum changes [31].

The present findings showed that patients who died had statistically lower counts for red blood cells, hemoglobin and platelets. Anemia has already been reported among HIV-

negative VL patients: its cause is probably multifactorial and may include immune-mediated mechanisms, changes to red blood cell membrane permeability, hypersplenism and hemolysis. Henn et al [32] found significantly lower hemoglobin and lymphocyte levels in their sample. The ability to modify the host immune response can be considered to be one of the main factors leading to thrombocytopenia [13, 27]. In addition, studies have shown that even after reasonable levels of CD4 counts and viral suppression of HIV have been reached, coinfecting patients do not keep the parasite under control, even months after starting antiretroviral therapy [26].

CONCLUSION

The study showed a high frequency of relapses among VL/HIV coinfecting patients, being associated with splenomegaly, adenomegaly and elevated urea and creatinine levels. The clinical variables of weight loss and edema and the laboratory variables of anemia and thrombocytopenia were associated with the outcome death. These data demonstrate the need to include other variables in the predictive models of prognosis when we talk about coinfecting patients, with the need to consider the physical examination in these models focusing on the search for signs and symptoms associated with severe outcomes such as splenomegaly, adenomegaly, weight loss, and edema. These data are even more important since coinfection is more prevalent in low- and middle-income countries where resources to perform complex exams are scarcer and where physical examination becomes a powerful tool to reduce recurrence and mortality in this population.

DECLARATIONS

Ethics approval and consent to participate

This research was registered, receiving a favorable opinion from the Ethics and Research Committee of the Hospital Universitário do Maranhão (Protocol: 409.351) of the city of São

Luís, state of Maranhão, Brazil. The patients in the study signed the Informed Consent Form, and their anonymity was guaranteed from the moment of data collection until the end of the research. Authorization was also obtained from the Coordination of Staging and Research of the Maranhão State Department of Health. All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This research was supported by the Research and Scientific and Technological Development Support Foundation of Maranhão (FAPEMA) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) [Finance Code 001].

Authors' contributions

LDNC analyzed, interpreted patient data and performed the analysis for discussion. USL collected the patients' data. VR performed the statistical analysis and analysis of the survey results. MISL reviewed the data and information. LAS reviewed the data and information. JI collected the data from the patients. CMPSA collected the patients' data and reviewed the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the hospital staff for their help with data collection.

Author details

¹Health Sciences Graduate Program, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil. ²Department of Morphology, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil. ³Health and Environment Graduate Program, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil. ⁴President Vargas State Hospital, São Luís, Maranhão, Brazil. ⁵Department of Medicine, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

References

1. Azevedo TS, Lorenz C, Chiaravalloti–Neto F. Risk mapping of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2019; 52:e20190240.
2. Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas. Number 9, December 2020. Washington, D.C.: PAHO, 2020. Available at: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53090>. Accessed 25 May 2021.
3. Ministério da Saúde, Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. Informações de Saúde (TABNET): Epidemiológicas e Morbidade. Available at: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>. Accessed 25 May 2021.
4. Lima URS, Vanolli L, Moraes EC, Ithamar JS, Azevedo CMPES. Visceral leishmaniasis in Northeast Brazil: What is the impact of HIV on this protozoan infection?. *PLoS One* 2019; 14:e0225875.
5. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania–HIV. Brasília, 2015. Available at: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_diagnostico_leishmania_hiv.pdf. Accessed 25 May 2021.

6. Sousa-Gomes ML, Romero GAS, Werneck GL. Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough?. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11:e0005772.
7. Viana GMC, Silva MACN, Garcia JVS, et al. Epidemiological profile of patients co-infected with visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Northeast, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2017; 50:613–20.
8. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos, 2018. Available at: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-paramanejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos>. Accessed 25 May 2021.
9. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas. Brasília: 2006.
10. Costa DL, Rocha RL, Chaves EB, Batista VG, Costa HL, Costa CH. Predicting death from kala-azar: construction, development, and validation of a score set and accompanying software. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016; 9(6):728–740.
11. Porto CC. Exame clínico. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
12. Ministério da Saúde, Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1 ed. 5º reimpressão. Brasília, 2014. Available at: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf. Accessed 25 May 2021.
13. Távora LG, Nogueira MB, Gomes ST. Visceral Leishmaniasis/HIV co-infection in northeast Brazil: evaluation of outcome. *Braz J Infect Dis* 2015; 19:651–6.

14. Santos GO, Jesus NPS, Cerqueira–Braz JV, Santos VS, Lemos LMD. Prevalence of HIV and associated factors among visceral leishmaniasis cases in an endemic area of Northeast Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2019; 52:e20180257.
15. Lindoso JAL, Moreira CHV, Cunha MA, Queiroz IT. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV AIDS* 2018; 10:193–201.
16. Guedes DL, Medeiros Z, Silva ED, et al. Visceral leishmaniasis in hospitalized HIV-infected patients in Pernambuco, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* . 2018; 99:1541–6.
17. Cloots K, Burza S, Malaviya P, et al. Male predominance in reported Visceral Leishmaniasis cases: Nature or nurture? A comparison of population–based with health facility–reported data. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14:e0007995.
18. Dahal P, Singh-Phulgenda S, Olliaro PL, Guerin PJ. Gender disparity in cases enrolled in clinical trials of visceral leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Mar 16;15(3):e0009204. doi: 10.1371/journal.pntd.0009204. PMID: 33725005; PMCID: PMC7963105. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7963105/> Accessed 01 Nov 2022.
19. Zhang H, Zhao J, Wang P, Qiao Z. Effect of testosterone on *Leishmania donovani* infection of macrophages. *Parasitol Res*. 2001; 87:674–6.
20. World Health Organization. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 2010. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>. Accessed 25 May 2021.
21. Yang YL, Xiang ZJ, Yang JH, Wang WJ, Xu ZC, Xiang RL. Adverse Effects Associated With Currently Commonly Used Antifungal Agents: A Network Meta-Analysis and Systematic Review. *Front Pharmacol*. 2021 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8585744/>. Accessed 28 May 2022.

22. Davy–Mendez T, Napravnik S, Zakharova O, et al. Acute HIV infection and CD4/CD8 ratio normalization after antiretroviral therapy initiation. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2018; 79:510–8.
23. Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez–Solar B, et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:298–319.
24. Croxford S, Kitching A, Desai S, et al. Mortality and causes of death in people diagnosed with HIV in the era of highly active antiretroviral therapy compared with the general population: an analysis of a national observational cohort. *Lancet Publ Heal* 2017; 2:e35–46.
25. Hurissa Z, Gebre–Silassie S, Hailu W, et al. Clinical characteristics and treatment outcome of patients with visceral leishmaniasis and HIV co–infection in northwest Ethiopia. *Trop Med Int Health*. 2010; 15: 848– 55.
26. Mohammed R, Fikre H, Schuster A, Mekonnen T, Griensven JV, Diro E. Multiple relapses of visceral leishmaniasis in HIV Co–Infected Patients: A case series from Ethiopia. *Curr Ther Res* 2020; 92:100583.
27. Fontoura I, Barbosa D, Andrade PAD, et al. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of human visceral leishmaniasis (HVL) associated with human immunodeficiency virus (HIV) coinfection: a systematic review. *Parasitol*. 2018; 145:1801–18.
28. Mahajan R, Das P, Isaakidis P, et al. Combination treatment for visceral leishmaniasis patients coinfecting with human immunodeficiency virus in India. *Clin Infect Dis* 2015; 61:1255–62.
29. Cota GF, De Sousa MR, Rabello A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV–infected patients: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5:e1153.

30. Diro E, Ritmeijer K, Boelaert M, et al. Use of pentamidine as secondary prophylaxis to prevent visceral leishmaniasis relapse in HIV infected patients, the first twelve months of a prospective cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9:e0004087.
31. Venter WDF, Fabian J, Feldman C. An overview of tenofovir and renal disease for the HIV-treating clinician. *South Afr J HIV Med* 2018; 19:1–8.
32. Henn, Guilherme Alves de Lima et al. Is Visceral Leishmaniasis the same in HIV–coinfected adults?. *Braz J Infect Dis* 2018; 22:92–98.

TABLE 1 Prognostic models were built by adding clinical and laboratory variables that are used by the Brazilian Ministry of Health for monitoring patients with visceral leishmaniasis.

Presence of factors	Clinical score	Laboratory score
Age		
2–20 years	-	-
20–40 years	1	1
> 40 years	2	2
Bleeding		
1–2 parts	1	1
3–4 parts	2	2
5–6 parts	3	3
AIDS	2	3
Edema	1	1
Icterus	1	1
Dyspnea	1	1
Bacterial infection	1	1
Leukocytes level < 1,500/mm ³	-	2
Platelets level < 50,000/mm ³	-	3
Renal insufficiency ^a	-	3
Maximum score	11	20

^aLow glomerular filtration rate (below 60 ml/min/mm²) or serum creatinine above upper levels for age.

TABLE 2 Frequencies of visceral leishmaniasis relapse and death according to general variables and drug therapy.

Variables	Follow-up adverse outcomes							
	Total		VL relapse		P	Death		P
	(n = 169)		(n = 70, 41.4%)			(n = 19, 11.2%)		
	n	(%)	Yes	No	Yes	No		
		(%)	(%)	(%)	(%)			
Sex					.461		1.000	
Male	151	(89.3)	(42.4)	(57.6)		(11.3)	(88.7)	
Female	18	(10.7)	(33.3)	(66.7)		(11.1)	(88.9)	
Age group					.120		.973	
19 to 29 years	40	(23.7)	(30.0)	(70.0)		(10.0)	(90.0)	
30 to 39 years	68	(40.2)	(42.7)	(57.3)		(11.8)	(88.2)	
40 to 49 years	47	(27.8)	(53.2)	(46.8)		(10.6)	(89.4)	
50 years or more	14	(8.3)	(28.6)	(71.4)		(14.3)	(85.7)	
VL drug therapy					.156		.585	
Liposomal amphotericin B	123	(72.8)	(46.3)	(53.7)		(13.0)	(87.0)	
Amphotericin B deoxycholate	27	(16.0)	(33.3)	(66.7)		(3.7)	(96.3)	
Meglumine antimoniate	10	(5.9)	(20.0)	(80.0)		(10.0)	(90.0)	
More than one drug	9	(5.3)	(22.2)	(77.8)		(11.1)	(88.9)	
Duration of medication use					.130		.343	
Up to 10 days	133	(78.7)	(45.1)	(54.9)		(12.8)	(87.2)	
11 to 30 days	29	(17.2)	(31.0)	(69.0)		(3.4)	(96.6)	
More than 30 days	7	(4.1)	(14.3)	(85.7)		(14.3)	(85.7)	
Length of treatment					.355		.108	
Less than 1 month	150	(88.8)	(43.3)	(56.7)		(12.0)	(88.0)	
1 to 6 months	16	(9.4)	(25.0)	(75.0)		(0)	(100)	
More than 6 months	3	(1.8)	(33.3)	(66.7)		(33.3)	(66.7)	
Antiretroviral therapy					.007		.323	
3TC +TNF + LPV/RTV	56	(33.1)	(55.4)	(44.6)		(14.3)	(85.7)	
3TC +TNF +EFV	78	(46.2)	(34.6)	(65.4)		(10.3)	(89.7)	
3TC +TNF +ATV +RTV	13	(7.7)	(15.4)	(84.6)		(0)	(100)	
3TC +DDI +LPV/RTV	15	(8.9)	(60.0)	(40.0)		(6.7)	(93.3)	
Other	7	(4.1)	(14.3)	(85.7)		(28.6)	(71.4)	

Duration of antiretroviral use					<.001		.650
Up to 6 months	123	(72.8)	(52.0)	(48.0)		(10.6)	(89.4)
More than 6 months	46	(27.2)	(13.0)	(87.0)		(13.0)	(87.0)
Previous VL relapse					<.001		.056
Yes	64	(37.9)	(95.3)	(4.7)		(17.2)	(82.8)
No	105	(62.1)	(8.6)	(91.4)		(7.6)	(92.4)

Abbreviations: VL, visceral leishmaniasis; 3TC, lamivudine; TNF, tenofovir; LPV/RTV, lopinavir/ritonavir; EFV, efavirenz; ATV, atazanavir; RTV, ritonavir; DDI, didanosine.

TABLE 3 Associations of signs and symptoms with visceral leishmaniasis relapse and death.

Variables	Follow-up adverse outcomes			
	VL relapse		Death	
	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value
Disease history data				
Fever	1.35 (.72–2.53)	.335	1.10 (.41–3.04)	.832
Hair loss	.80 (.28–2.16)	.667	–	.133
Diarrhea	1.06 (.57–1.98)	.828	.83 (.30–2.20)	.707
Vomiting	.97 (.46–2.03)	.954	.87 (.23–2.70)	1.000
Bleeding	1.27 (.55–2.91)	.555	.56 (.12–2.57)	.743
Cough	1.16 (.59–2.27)	.658	.83 (.25–2.39)	.740
Dyspnea	.87 (.44–1.71)	.702	1.80 (.65–4.84)	.229
Increased abdominal volume	1.00 (.51–1.94)	.987	1.31 (.45–3.56)	.584
Physical evaluation				

Emaciation	.93 (.49–1.75)	.832	3.83 (1.15–17.11)	.043
Febrile	1.03 (.49–2.16)	.922	1.69 (.55–4.77)	.313
Jaundice	.75 (.31–1.73)	.502	1.96 (.58–5.87)	.225
Alopecia	.44 (.09–1.65)	.362	–	.364
Spotting	1.75 (.49–6.49)	.528	1.83 (.25–8.52)	.356
Bleeding	1.26 (.41–3.76)	.665	2.14 (.44–8.05)	.381
Edema	.75 (.24–2.13)	.588	4.05 (1.13–13.17)	.012
Dyspnea	.61 (.18–1.84)	.385	.50 (.02–3.09)	1.000
Abdominal protrusion	1.16 (.57–2.34)	.669	.76 (.20–2.33)	.784
Hepatomegaly	.81 (.41–1.61)	.557	1.60 (.52–5.89)	.592
Splenomegaly	2.20 (1.13–4.37)	.018	1.66 (.58–5.39)	.346
Adenomegaly	3.11 (1.02–10.52)	.037	.54 (.02–3.36)	1.000

Abbreviations: VL, visceral leishmaniasis; OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

TABLE 4 Median and interquartile range of serum biomarkers according to visceral leishmaniasis relapse and death by the time of the follow-up.

Variables	VL relapse			Death		
	Yes	No	<i>p</i> value	Yes	No	<i>p</i> value
	Median	Median		Median	Median	
	[IQR]	[IQR]	[IQR]	[IQR]		
Red blood cells (million/mm ³)	3.23 [2.76–3.67]	3.19 [2.58–3.65]	.884	2.77 [2.33–3.36]	3.27 [2.73–3.70]	.012

Hemoglobin (g/dl)	8.95	8.70	.472	7.90	8.90	.017
	[7.70–10.80]	[7.40–10.20]		[6.70–8.70]	[7.60–10.70]	
Hematocrit (%)	26.7	26.4	.686	24.3	26.8	.054
	[23.2–32.8]	[22.6–31.6]		[20.0–27.8]	[23.1–32.0]	
Leukocytes (1000/mm ³)	2.08	2.30	.421	2.04	2.26	.790
	[1.44–3.88]	[1.60–3.73]		[1.37–4.02]	[1.55–3.77]	
Platelets (1000/mm ³)	120.5	121.0	.510	52.5	155.0	<.001
	[82.0–150.0]	[87.0–186.0]		[33.0–81.0]	[122.0–215.0]	
AST (U/l)	41.0	41.0	.640	48.0	40.0	.211
	[28.0–60.0]	[27.0–59.0]		[37.0–76.0]	[27.0–59.0]	
ALT (U/l)	28.5	31.0	.606	24.0	29.0	.331
	[18.0–63.0]	[20.0–55.0]		[17.0–43.0]	[20.0–46.0]	
Urea (mg/dl)	39.5	32.0	.005	44.5	34.0	.122
	[27.5–51.5]	[23.0–40.0]		[28.0–56.0]	[25.0–45.0]	
Creatinine (mg/dl)	1.02	.76	<.001	1.03	.87	.182
	[.84–1.23]	[.56–0.93]		[.69–1.36]	[.67–1.09]	

Abbreviations: VL, visceral leishmaniasis; IQR, interquartile range [1st quartile – 3rd quartile]; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

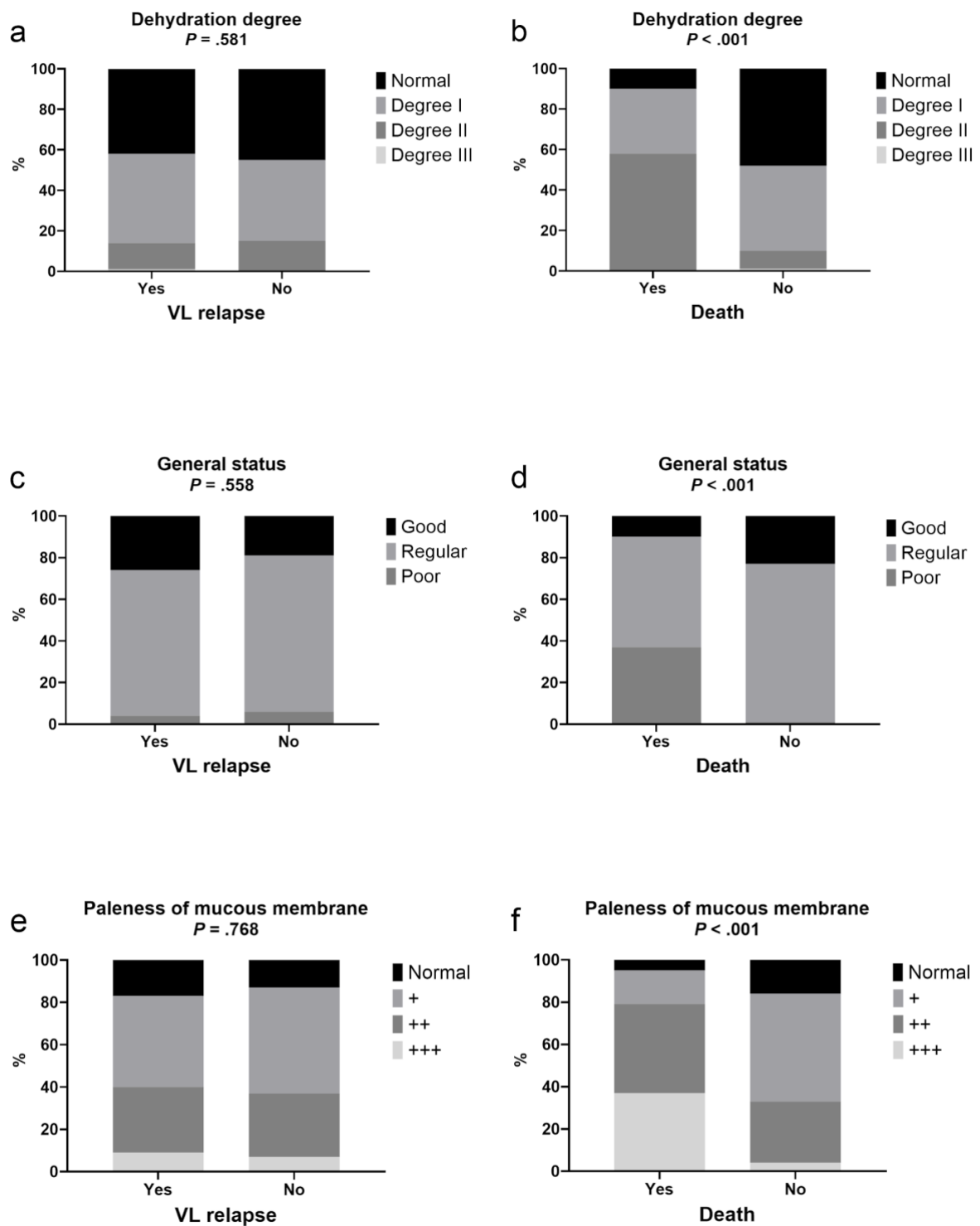


FIGURE 1 Frequencies of different degrees of dehydration (a, b), general status (c, d) and paleness of mucous membrane (e, f) according to visceral leishmaniasis relapse and death by the time of the follow-up. Abbreviation: VL, visceral leishmaniasis.

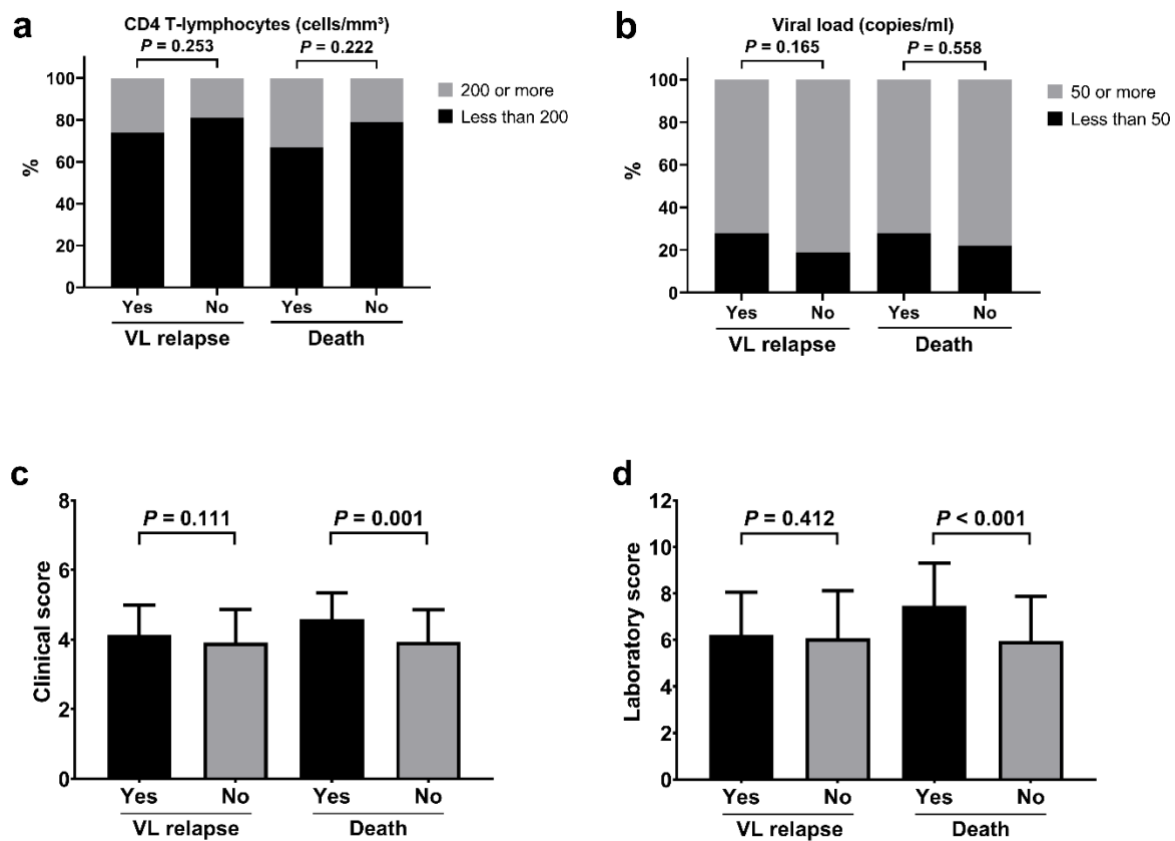


FIGURE 2 Frequencies of categories of CD4 T lymphocytes (a) and viral load (b), and mean with standard deviation of clinical score (c) and laboratory score (d), according to VL relapses and deaths by the time of the follow-up. Abbreviation: VL, visceral leishmaniasis.

TABLE 5 Multiple logistic regression model of clinical factors on the VL relapse and hospital death.

Variables	Adjusted OR	(95% CI)	<i>p</i> value
Outcome: VL relapse			
Antiretroviral use (more than 6 months)	.10	(.03–0.31)	<.001
Splenomegaly	1.81	(.84–3.90)	.129
Adenomegaly	4.65	(1.11–19.45)	.035
Outcome: hospital death			
Emaciation	1.15	(.23–5.63)	.862
Edema	12.36	(2.59–58.78)	.001
Dehydration (degree II/III)	6.36	(1.51–26.69)	.011
General health status (poor)	33.08	(4.46–245)	.000
Paleness (++/+++)	4.78	(1.12–20.39)	.034

VL, visceral leishmaniasis; OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval. Model 1 was adjusted for age, sex, duration of antiretroviral use, splenomegaly, and adenomegaly. Model 2 was adjusted for age, sex, duration of antiretroviral use, emaciation, edema, dehydration, general status, and paleness.

5.2. Perfil sérico Th1/Th2/Th17 de citocinas em pacientes co-infectados com VL/HIV em região altamente endêmica

Artigo científico ainda será submetido.

Larissa Di Leo Nogueira Costa¹;

Antônio Henrique Braga Martins de Aguiar²;

Cristiane Michele Sampaio Cutrim²;

Gustavo de Almeida Santos²;

Uiara Regina Silva de Lima;

Lucilene Amorim Silva^{3,4};

Johnny Ramos do Nascimento³;

Hivana Patricia Melo Barbosa Dall'Agnol^{1,3,4};

Leonardo Teixeira Dall'Agnol^{1,2};

Conceição de Maria Pedrozo Silva de Azevedo^{1,3,4},

Mayara Ingrid Sousa Lima^{1,2,3};

¹Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão. São Luís, Brasil.

²Programa de Pós Graduação em Saúde e Ambiente Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão. São Luís, Brasil.

³Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão. São Luís, Brasil.

⁴Departamento de Medicina da Universidade Federal do Maranhão. São Luís, Brasil.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença endêmica na América Latina, e o quadro clínico piora quando o paciente possui coinfeção com outros agentes, especialmente o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Nestes pacientes, observa-se uma resposta imunológica complexa, com envolvimento de diversas citocinas pró, anti-inflamatórias e moduladoras. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil da produção de citocinas Th1/Th2/Th17 em pacientes com coinfeção LV/HIV e sua relação em uma área altamente endêmica. Este é um estudo descritivo-comparativo transversal realizado com 50 pacientes, estratificados em dois grupos: LV/HIV e LV no estado do Maranhão, Brasil. Foram obtidas informações clínicas e epidemiológicas e foi realizada uma coleta sorológica para avaliar a produção de citocinas. Como resultados, o presente estudo identificou que os pacientes coinfectados com LV/HIV são predominantemente do sexo masculino (84,0%); a frequência de morte e recidiva é de 8,0% e 32%, respectivamente. Quanto a concentração de citocinas dos pacientes coinfectados e monoinfectados, observou-se que havia uma diferença estatisticamente significativa na produção de IL-2 e IL-10 entre os grupos. Além disso, nos pacientes coinfectados existe uma correlação positiva moderada ou forte e estatisticamente significativa na produção de IL-2 e IL-4; IL-2 e IL-6; IL-4 e TNF; IL-4 e IL-6; IL-6 e TNF. No entanto, ao subdividir o grupo LV/HIV, o estudo identificou que não houve diferença para nenhuma das variáveis analisadas, considerando sintomas e sinais clínicos, recidiva, morte, parâmetros laboratoriais e escore de gravidade clínica, demonstrando que a produção diferenciada de citocinas não apresentou uma correlação com um quadro clínico específico de um subgrupo. Assim, os dados demonstram que os pacientes com LV/HIV, homoganeamente, apresentaram produção direta de citocinas específicas o que pode agravar o processo.

Keywords: Resposta inflamatória. Leishmaniose visceral. AIDS. Maranhão-Brasil

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave que, quando deixada sem tratamento, pode ser fatal. É causada por protozoários da Ordem Kinetoplastidae, Família Trypanosomatidae, Gênero *Leishmania*. Nas Américas, a transmissão é zoonótica e a espécie considerada como sendo o agente causador é *Leishmania (Leishmania) infantum (syn L. chagasi)*. Caracteriza-se por febre irregular de longa duração, anemia e hepatoesplenomegalia, que ocorre progressivamente (LAINSON et al, 1987; BRASIL, 2009; PAHO, 2022).

Alguns estudos relatam que a relação da produção de Th1/Th2 está diretamente ligada as características clínicas e graus de severidade das infecções nos casos de pacientes coinfectados, com diminuição da resposta Th1 e aumento da resposta Th2, onde ambos desempenham um papel importante no agravamento da infecção. Com desenvolvimento de formas clínicas mais relevantes associadas ao predomínio de células Th2, TGF- β , IL-4 e IL10 que prejudicam a atividade antiparasitária dos macrófagos. Assim como as interleucinas associadas ao controle da LV são capazes de ativar a resposta imune adquirida sendo capazes de eliminar os parasitas como IL-12, IL-17, INF- γ e TNF- α (DAYAKAR et al, 2019; SILVA et al, 2022).

Outros estudos indicam que polimorfismos nos genes das interleucinas relacionados ao sistema imunológico podem ser responsáveis pela progressão da doença, sugerindo que outros fatores e inclusive outras citocinas podem estar relacionadas. Não sendo possível explicar a complexidade das respostas

imunológicas diante da coinfeção somente através de um modelo (MERA-RAMIREZ et al, 2017).

Devido ao potencial de letalidade e imunopatogenia complexa da coinfeção LV/HIV, este estudo visa investigar o perfil das citocinas Th1/Th2/Th17 na coinfeção LV/HIV no estado do Maranhão - Brasil, uma área endêmica, uma vez que se tornam extremamente importantes para a elucidação dos mecanismos imunopatológicos, com aplicabilidade clínica para um diagnóstico direcionado, tratamento precoce, bem como apoio terapêutico específico e conseqüentemente melhor prognóstico.

METODOS

Desenho do estudo e Amostra

Este é um estudo comparativo de caso-controle transversal. Os pacientes foram divididos em dois grupos: (I) Grupo 1 (caso) consistiu em 25 indivíduos com sorologia positiva para HIV, coinfectados com LV com presença confirmada do diagnóstico de *Leishmania spp.* na medula óssea ou gânglio, visto no hospital estatal de referência, no ano de 2018 e (II) Grupo 2 (controle) consistiu em 25 indivíduos diagnosticados com Leishmaniose visceral (com presença confirmada de *Leishmania spp.* na medula óssea ou gânglio também) e não coinfectados com HIV. Foram coletadas amostras prospectivamente, abordando pacientes admitidos com o diagnóstico de coinfeção para tratamento em um hospital estatal de referência para doenças infecciosas parasitárias na cidade de São Luís, estado do Maranhão, Brasil.

A amostra do estudo incluiu pacientes de ambos os sexos, com mais de 18 anos de idade, sorologicamente positivos ao HIV e com diagnóstico parasitológico de

LV, de acordo com as orientações do Ministério da Saúde brasileiro (BRASIL, 2006; BRASIL, 2008).

O diagnóstico da LV foi feito através da procura de amastigotas de *Leishmania spp* por mielograma, considerado o padrão de ouro para o diagnóstico desta infecção. Para o teste sorológico, foram utilizadas a imunofluorescência indirecta (Rifi) e ELISA, realizadas no Laboratório Central do Maranhão (LACEN-MA). O HIV foi diagnosticado utilizando o teste rápido de HIV e o teste ELISA, que são rotineiramente realizados no hospital estadual de referência seguindo recomendações do Ministério da Saúde brasileiro (BRASIL, 2015). Os critérios de exclusão foram a falta de tratamento de seguimento no hospital e a incompletude dos registos laboratoriais.

Citocinas

Para a dosagem de citocinas, o soro foi obtido a partir de amostras de sangue colhidas dos pacientes. As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e IFN γ foram medidas utilizando o BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, em citómetro BD FACSCalibur™ seguindo o protocolo do fabricante.

Coleta de dados

As variáveis utilizadas no estudo foram: sexo, recidiva, morte, a presença de hemorragia, edema, icterícia, vômitos, dispneia, infecção bacteriana, contagem de leucócitos, contagem de plaquetas, e dosagem de creatinina, bem como o cálculo da gravidade em LV (KalaCal) (COSTA et al, 2016) que se baseou nos escores de gravidade propostos pelo Ministério da Saúde brasileiro (BRASIL, 2006). A recidiva foi definida como o retorno dos sintomas no prazo de 12 meses após a cura clínica. A

morte foi definida como ocorrência após a confirmação dos diagnósticos de LV dos pacientes (BRASIL, 2015). Todas estas variáveis foram correlacionadas com a dosagem de citocinas no grupo de pacientes da LV/HIV.

Análise estatística

Os dados foram processados utilizando as estatísticas do programa GraphPad Prism 8.0.2® e RStudio 1.4.1717 para a análise dos resultados, as variáveis categóricas foram apresentadas como frequências absolutas (n) e relativas (%). A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro Wilk e foram utilizados diagramas de dispersão para apresentar os dados das citocinas. A comparação da dosagem de citocinas entre os grupos foi feita utilizando o teste não paramétrico Mann Whitney. Foi utilizada a correlação de pessoas para comparar citocinas entre si, bem como para avaliar a correlação entre os dados de laboratório, os resultados de gravidade e a produção de citocinas. Para todas as análises, foi adotado um nível de significância de 5%.

Considerações éticas

O projeto de investigação foi registado no Plataforma Brasil, e a aprovação do Comitê de Ética foi recebida do Hospital Universitário do Maranhão (HUUFMA; Número do protocolo: 409.351). Todos os pacientes do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

RESULTADOS

Caracterização do grupo coinfectedo LV/HIV

A frequência de morte e recidiva de pacientes coinfetados com LV/HIV é de 8,0% e 32%, respectivamente. A maioria dos pacientes eram do sexo masculino (84%), com uma idade média de 42,04 anos e não apresentavam sintomas clínicos graves, tais como hemorragias, icterícia, edema, vômitos ou dispneia (Figura 1). A infecção bacteriana foi o sintoma mais comum, ocorrendo em 52% dos casos. A maioria dos pacientes apresentou contagens de leucócitos, plaquetas e creatinina fora dos intervalos esperados de 4000-11000mm³, 150000-450000mm³ e 0,5-1,2mg/dL (5000-12000ug/dL), respectivamente. 76% dos pacientes apresentaram leucopenia e trombocitopenia.

Perfil sérico da produção de citocinas

Quando a concentração de citocinas dos pacientes com e sem coinfecção foi avaliada, observou-se que havia uma diferença estatisticamente significativa na produção de IL-2 e IL-10 ($p < 0,05$), e estas são produzidas em maiores quantidades no grupo de pacientes LV em comparação com LV/HIV. Contudo, não houve diferenças significativas na produção das outras citocinas estudadas quando se compararam os dois grupos, como mostra a Figura 2. No grupo de pacientes coinfetados existe uma correlação positiva moderada ou forte e estatisticamente significativa, quando se comparam duas citocinas entre si, na produção de IL-2 e IL-4; IL-2 e IL-6; IL-4 e TNF; IL-4 e IL-6; IL-6 e TNF (Tabela 1). O grupo de pacientes monoinfetados, por outro lado, mostrou uma correlação positiva entre IL-2 e IL-4; IL-2 e IL-10; IL-2 e TNF; IL-4 e IL-10; IL-4 e TNF; IL-10 e TNF; IFN γ e IL-17A, e as outras correlações não são estatisticamente significativas, como se pode ver na Tabela 2.

Perfil citocínético e traços clínico-epidemiológicos

O perfil de citocinas dos pacientes com coinfeção, subdividindo este grupo de acordo com parâmetros clínicos e epidemiológicos, mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa para nenhuma das variáveis analisadas, considerando os subgrupos que apresentavam ou não sintomas e sinais clínicos, recidiva ou morte. Este mesmo resultado foi observado ao correlacionar a produção de citocinas, parâmetros laboratoriais dos pacientes e a pontuação de gravidade para a leishmaniose visceral, sem correlação estatisticamente significativa entre estas variáveis.

DISCUSSÃO

O presente estudo caracterizou uma população de pacientes com coinfeção LV/HIV, em uma área de elevada endemicidade, com relação à produção de citocinas do perfil Th1/Th2/Th17, correlacionando-se com parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O grupo estudado é majoritariamente composto por indivíduos do sexo masculino.

Esta predominância, sistematicamente explicada na literatura, não é um fenômeno bem esclarecido, podendo haver uma relação com uma maior exposição dos homens aos vectores ou a influência das diferenças hormonais na dinâmica da relação parasito-anfitrião da leishmaniose (CLOOTS et al, 2020). Outros estudos indicam não ser possível explicar a predominância masculina apenas por um fator como o hormonal, devendo ser levado em consideração outros fatores como menor exposição da população feminina (DAHAL et al, 2021). Em estudo realizado com amostras do mesmo hospital de referência, os dados foram ratificados quando foi encontrado uma predominância masculina na amostra. A idade média identificada foi

de 36,9 anos (+/- 9,27 anos), com uma predominância de pacientes provenientes do interior do estado do Maranhão (LIMA et al, 2019).

Muitos casos de coinfeção são mais graves e atípicos, com um maior número de mortes, é possível que o atraso no diagnóstico de coinfeção em pacientes com HIV ou LV resulte no atraso do tratamento, levando a uma progressão descontrolada das duas doenças no mesmo paciente. Além disso, a ausência de reconstituição imunitária e a ocorrência anterior de recidiva foram identificados como fatores de risco relevantes para a morte (LINDOSO et al, 2018; SANTOS et al, 2019).

Neste estudo, observou-se que os níveis de citocinas dos pacientes com e sem coinfeção apresentavam diferenças significativas na produção de IL-10 e IL-2, o que pode ser interpretado como sinais de gravidade para a LV. Alguns estudos relatam que existe um papel-chave das principais citocinas na patogênese da LV, por exemplo IL-10, *Transforming Growth Factor* (TGF) $-\beta$, IL-4, IL-6, IL-12 e IFN- γ , o que implica no papel de Th1/Th2 na progressão da doença ou na proteção do hospedeiro, demonstrando a resposta do tipo Th1 mediando a resistência do hospedeiro e a resposta do tipo Th2 associada à progressão da doença (DAYAKAR et al, 2019; SILVA et al, 2022).

Outros autores indicam ainda que somente um modelo não pode explicar todas as formas de controle das respostas imunes no paciente frente a infecção pela *Leishmania spp.*, podendo haver diversos modelos associados ou não que podem contribuir para o agravamento ou melhora da doença como por exemplo os polimorfismos, imunidade inata e adquirida ou até outras citocinas (SHEHADEH et al, 2019; SILVA et al, 2022).

A presença de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-6 e IFN γ , como se vê neste trabalho, pode estar relacionada com a ativação

imunológica persistente observada durante a fase crônica da infecção pelo HIV, gerando uma resposta inflamatória. Estudos na Índia demonstraram que o TNF- α , um mediador vital das respostas inflamatórias inatas e adaptativas, desempenha um papel crucial na formação e manutenção do granuloma contra a leishmaniose visceral (DAYAKAR et al, 2019).

Para pacientes com LV apenas, esta correlação altamente positiva foi observada entre IL-2 e IL-10, pois a IL-2 estimula a replicação de células T com funções reguladoras, cujas ações são mediadas pela IL-10, o que suprime a resposta celular protetora do hospedeiro. Sobre a correlação negativa observada entre IL-10 e IFN γ , justifica-se imediatamente que a IL-10 modula a ativação Th1, o que leva a uma redução da produção de IL-12 e IFN γ , e inibe a ativação de macrófagos e a capacidade destas células em destruir *Leishmania spp.* O índice de proliferação e a produção de IFN γ são reduzidos na presença de neutralizadores juntamente com a IL-10 recombinante, fato que realça a importância destas citocinas na patogênese da LV. A compreensão do equilíbrio dos perfis das citocinas pode levar a manipulações imunológicas, incluindo terapias anti-citocinas (anti-IL-6 e anti-IL-10), e novas estratégias terapêuticas para LV e LV/HIV (COSTA et al, 2013; BARBOSA et al, 2020).

Este estudo avaliou também o perfil imunológico dos doentes com LV/HIV com as suas características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais, não tendo sido encontradas diferenças significativas na produção de citocinas nos subgrupos. Estes dados podem ser explicados pela pequena dimensão da amostra destes subgrupos (Figura 1). Após estratificação, considerando a presença e ausência de sinais e sintomas clínicos tais como: hemorragia, edema, icterícia e vômitos, os subgrupos com indivíduos que apresentaram estes parâmetros clínicos foram formados por um pequeno número de indivíduos dentro da população (<20%). Neste sentido,

acreditamos que é necessário avaliar um grupo populacional mais amplo para melhor caracterizar a relação entre o perfil imunológico e os parâmetros clínicos em doentes com LV/VIH.

Os nossos dados demonstram que os doentes LV/HIV têm um agravamento do seu comprometimento imunitário, à medida que esta doença progride com a imunossupressão do sistema imunológico, com uma diminuição dos linfócitos T e outras linhas celulares hematopoiéticas. Assim, a produção direta de citocinas ou a sua redução, por estímulos patogênicos ou indiretamente pelo próprio grau de ativação do sistema imunitário, acaba por sustentar e agravar este processo.

REFERÊNCIA

BARBOSA, T.L.D.A.; GOMES, L.M.X.; HOLZMANN, A.P.F.; CARDOSO, L.; PAULA, A.M.B.D.; HAIKAL, D.S.A. Prática de aconselhamento em infecções sexualmente transmissíveis, HIV e aids, realizada por profissionais da atenção primária à saúde de Montes Claros, Minas Gerais, 2015-2016. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.29, 2020.

BRASIL. **AIDS 2009**: versão preliminar. Boletim Epidemiológico: AIDS/DST. 2009. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/> Acessado em 24 de março de 2010.

BRASIL. **Informações de Saúde (TABNET): Epidemiológicas e Morbidade**. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. 2021. Available at: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>. Accessed 25 May 2021.

BRASIL. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV**. 1. ed., rev. e ampl. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_diagnostico_leishmania_hiv.pdf>. Acesso em 14 maio 2021.

BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. 2018. Available at: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-paramanejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos>. Accessed 25 May 2021.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf>. Acesso em: 09 fev 2021.

CLOOTS, K.; BURZA, S.; MALAVIYA, P. et al. Male predominance in reported Visceral Leishmaniasis cases: Nature or nurture? A comparison of population-based with health facility-reported data. **PLoS Negl Trop Dis**, v.14, 2020.

COSTA, D.L.; ROCHA, R.L.; CARVALHO, R.M.; LIMA-NETO, A.S.; HARHAY M.O.; COSTA, C.H.N.; BARRAL, A.P. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and global health**, v.107, n.2, 2013.

COSTA, D.L.; ROCHA, R.L.; CHAVES, E.B.; BATISTA, V.G.; COSTA, H.L.; COSTA, C.H. Predicting death from kala-azar: construction, development, and validation of a score set and accompanying software. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.9, 2016.

DAHAL, P.; SINGH-PHULGENDA, S.; OLLIARO, P.L.; GUERIN, P.J. Gender disparity in cases enrolled in clinical trials of visceral leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**. v.15, n.3, 2021.

DAYAKAR, A.; CHANDRASEKARAN, S.; KUCHIPUDI, S.V.; KALANGI, S.K. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. **Front Immunol**. v.10, 2019.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. **Academic Press**. 1987.

LIMA, U.R.S.; VANOLLI, L.; MORAES, E.C.; ITHAMAR, J.S.; AZEVEDO, C.M.P.E.S. Visceral leishmaniasis in Northeast Brazil: What is the impact of HIV on this protozoan infection?. **PLoS One**, v.14, 2019.

LINDOSO, J.A.L.; MOREIRA, C.H.V.; CUNHA, M.A.; QUEIROZ, I.T. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. **HIV AIDS**, v.10, 2018.

MERA-RAMÍREZ, A.; CASTILLO, A.; OROBIO, Y.; GÓMEZ, M.A.; GALLEGOMARIN, C. Screening of TNF α , IL-10 and TLR4 single nucleotide polymorphisms in individuals with asymptomatic and chronic cutaneous leishmaniasis in Colombia: a pilot study. **BMC Infect. Des**. v.17, n.177, 2017.

PAHO. Pan American Health Organization, 2020. **Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas**. 9. Washington, D.C.: PAHO. Available at: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53090>. Accessed 25 May 2022.

SANTOS, G.O.; JESUS, N.P.S.; CERQUEIRA-BRAZ, J.V.; SANTOS, V.S.; LEMOS, L.M.D. Prevalence of HIV and associated factors among visceral leishmaniasis cases in an endemic area of Northeast Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.52, 2019.

SHEHADEH, F.V.B et al. TGF- β 1 polymorphism in American tegumentary leishmaniasis in a Southern Brazilian population. *Rev. Soc. Sutiás. Med. Tropa*, v.52, n.3, 2019. *Rev. Soc. Bras. Med.* 2019.

SILVA, R.R; VASCONCELOS, F.S.F.; TAVARES, D.D.S; SANTOS, P.L. Association between interleukin 10 (IL-10) polymorphisms and leishmaniasis progression: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* v.12, n.1, 2022.

SILVA, R.R; VASCONCELOS, F.S.F.; TAVARES, D.D.S; SANTOS, P.L. Association between interleukin 10 (IL-10) polymorphisms and leishmaniasis progression: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* v.12, n.1, 2022.

Figure 1: Frequency of symptoms among VL/HIV coinfecting patients

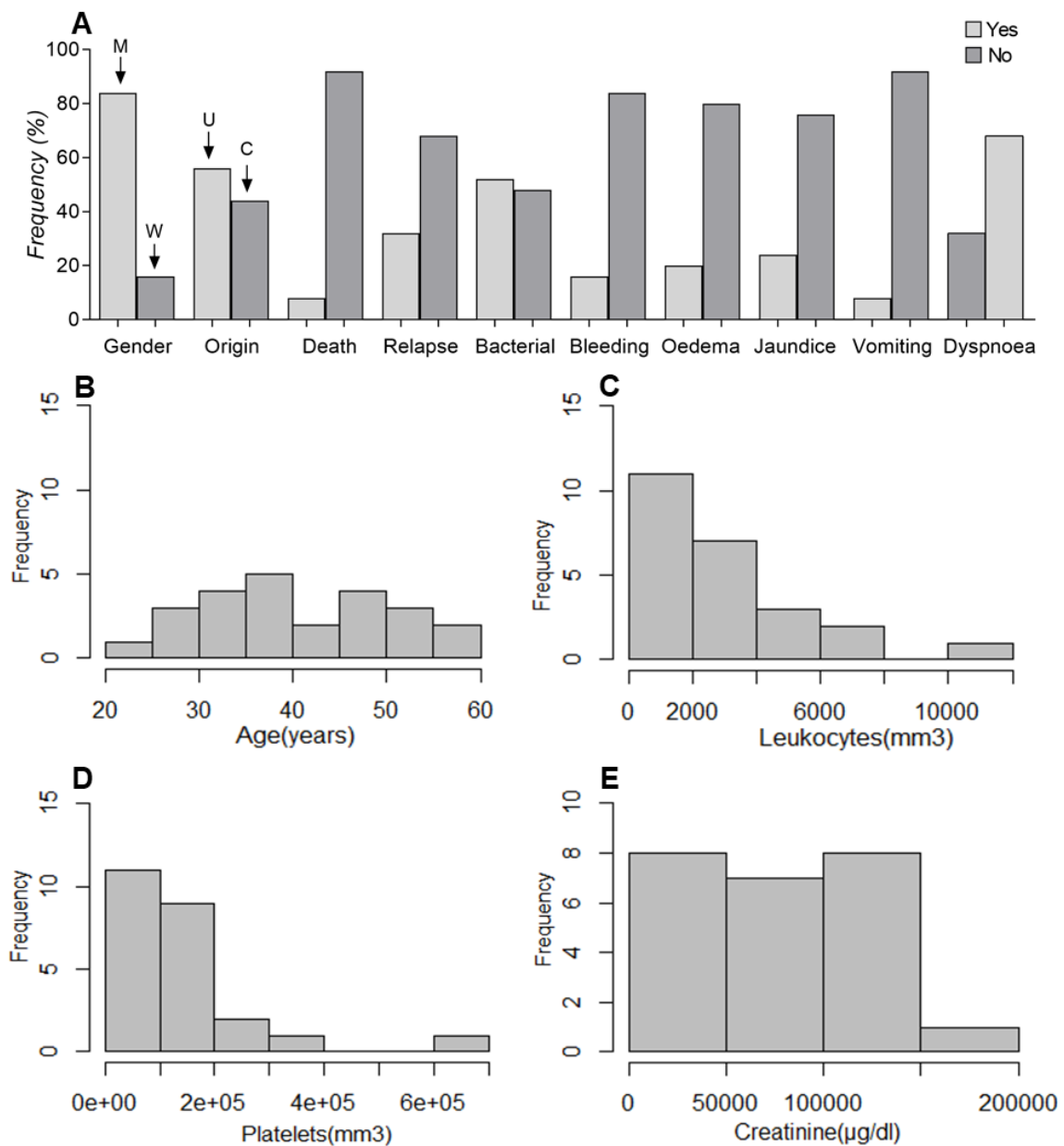


Table 1. Linear correlation of cytokine production profile in patients with VL/HIV coinfection.

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF	IFN γ	IL-17A
IL-2	1.00	0.96*	0.44*	0.05	0.24	-0.05	-0.03
IL-4	0.96*	1.00	0.68*	0.02	0.51*	-0.06	-0.07
IL-6	0.44*	0.68*	1.00	-0.09	0.97*	-0.08	-0.10
IL-10	0.05	0.02	-0.09	1.00	-0.09	-0.06	-0.11
TNF	0.24	0.51*	0.97*	-0.09	1.00	-0.06	-0.07
IFN γ	-0.05	-0.06	-0.08	-0.06	-0.06	1.00	-0.02
IL-17A	-0.03	-0.07	-0.10	-0.11	-0.07	-0.02	1.00

R-value: quantitative values entered in the table. *P value<0.05.

Table 2. Linear correlation of cytokine production profile in VL patients.

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF	IFNγ	IL-17A
IL-2	1.00	0.98*	-0.07	0.91*	0.99*	-0.9	-0.13
IL-4	0.98*	1.00	0.05	0.91*	0.99*	-0.13	-0.10
IL-6	-0.07	-0.05	1.00	-0.14	-0.06	-0.09	-0.07
IL-10	0.91*	0.91*	-0.14	1.00	0.91*	-0.08	0.01
TNF	0.99*	0.99*	-0.16	0.91*	1.00	-0.11	-0.11
IFNγ	-0.09	-0.13	-0.09	-0.08	-0.11	1.00	0.55*
IL-17A	-0.13	-0.10	-0.07	0.01	-0.11	0.55*	1.00

R-value: quantitative values entered in the table *P value < 0.05.

ANEXOS

ANEXO I

FICHA PROTOCOLO

FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

Data de Preenchimento ____/____/____ N°de Registro _____

A- IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Cor: _____ Ocupação: _____

Local de Nascimento: _____ Data ____/____/____

Endereço para contato: _____

B- EPIDEMIOLOGIA

Local provável de contágio: _____

Reside em área de risco: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Existem cães no domicílio/peri-domicílio: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Existem raposas/gambas nas proximidades: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Existem animais doentes nas proximidades: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Existem mosquitos no domicílio/peri-domicílio: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Número de familiares em casa (Excluir paciente): _____

Localidades freqüentadas nos últimos 12 meses

MUNICÍPIO / UF	MÊS / ANO	TEMPO

C-ANTECEDENTES MÓRBIDOS PESSOAIS

História anterior de calazar: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Caso sim: Há quanto tempo? _____ Droga: _____

Dose: _____ Tempo _____ Onde tratou _____

D- ANTECEDENTES MORBIDOS FAMILIARES

História anterior de calazar: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Caso sim: Quem? _____ Há quanto tempo? _____

E- HISTÓRIA CLÍNICA

Início da doença: _____

Sinais e sintomas: _____

Febre: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Caso sim, caracterizar: _____

Queda de cabelos/pelos: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Anorexia: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Diarréia: () 1. Sim. 2. Não 9. Ignorado

Caso sim, caracterizar: _____

Vômitos: () 1. Sim. 2. Não 9. Ignorado

Sangramentos: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Caso sim, caracterizar: _____

Tosse: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Dispnéia: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Aumento de volume abdominal: () 1. Sim. 2. Não 9. Ignorado

Outros sintomas:

F- EXAME FÍSICO

P.A: ___/___/___ Pulso: _____ T.A: _____ F.R: _____ Peso _____ Alt. _____

Estado geral: () 1- Bom () 2. Regular () 3- Comprometido

Estado de Hidratação () 1. Normal () 2- Desidratado grau I

() 3. Desidratado grau II () 4- Desidratado grau III

Emagrecido () 1- Sim 2. Não

Febril () 1- Sim 2. Não

Mucosas: () 1. Normocoradas () 2. Hipocoradas+/4+ () 3. Hipocoradas++/4+

() 4. Hipocoradas+++/4+ () 5. Hipocoradas ++++/4+

Ictérico: () 1- Sim 2. Não

Alopecia: () 1- Sim 2. Não
Manchas: () 1- Sim 2. Não
Sangramento: () 1- Sim 2. Não
Adenomegalia: () 1- Sim 2. Não
Caso sim: Localização: () 1. Suboccipital() 2. Submandibular
() 3. Inguinal () 4. Retroauricular
() 5. Retrocervical() 6. Axilar

Características: () 1. Isolados () 2. Normal
() 3. Agrupados () 4. Amolecidos
() 5. Coalescentes () 6. Endurecidos

Protusão Abdominal: () 1- Sim 2. Não

Hepatomegalia: () 1- Sim 2. Não

Caso Sim: _____ cm RCD _____ cm Apêndice Xifóide

Esplenomegalia: () 1- Sim 2. Não

Caso Sim: _____ cm RCE

Edema () 1- Sim 2. Não

Caso Sim, caracterizar: _____

Alterações Ap. Cardio Vascular: () 1- Sim 2. Não

Caso sim, especificar: _____

Alterações Ap. Respiratório: () 1- Sim 2. Não

Caso sim, especificar: _____

Alterações Sist. Nervoso Central: () 1- Sim 2. Não

Caso sim, especificar: _____

Outras alterações: () 1- Sim 2. Não

Caso sim, especificar: _____

G- TERAPÊUTICA (Calazar)

Usou ou está em uso de droga específica: () 1- Sim 2. Não 9- Ignorado

Caso sim, Qual: _____

Dose ? Número de ampolas (Total e por dia): _____

Tempo se Uso: _____

Início do Tratamento: _____

Ocorreu internação durante a doença atual: () 1- Sim 2. Não. 9- Ignorado
Caso sim. Há quanto tempo/Por quanto tempo: _____ onde:

CONDUTA:

H- TERAPÊUTICA (HIV)

Usou ou está em uso de droga específica: () 1- Sim 2. Não() 9- Ignorado

Caso sim, Qual: _____

Dose ? Número comprimidos (Total e por dia): _____

Tempo se Uso: _____

Início do Tratamento: _____

CONDUTA:

I- EXAMES LABORATORIAIS

EXAMES	DATAS			
HEMÁCIAS				
HEMOGLOBINA				
HEMATÓCRITO				
LEUCOCITOS				
META				

BASTÕES				
SEGMENTADOS				
EOSINÓFILOS				
LINFÓCITOS				
MONÓCITOS				
PLAQUETAS				
T.PROTROMBINA				
AST/ALT	/	/	/	/
UREIA				
CREATININA				
GLOBULINA				
GLICEMIA				
MIELOGRAMA				
CD4				
CV HIV				
ECG				
VEL. HEMOSSED.				
OUTROS				
TESTE RÁPIDO				
ELISA				

J – EVOLUÇÃO CLÍNICA

Regressão da Febre: () 1- Sim 2. Não 9- Ignorado

Caso sim, Quantos dias após o início do tratamento: _____ caso

Não, Descreva a febre: _____

Regressão do edema: () 1- Sim 2. Não 9- Ignorado

Caso sim, Quantos dias após o início do tratamento: _____ caso

Não, Descreva a febre: _____

Regressão da Hepatomegalia: () 1- Sim 2. Não 9- Ignorado

Regressão da Esplenomegalia: () 1- Sim 2. Não 9- Ignorado

Óbito: () 1- Sim 2. Não () 9- Ignorado

Alta Hospitalar: () 1- Sim 2. Não() 9- Ignorado

K - RECIDIVIA

() Sim* () Não

*Caso Sim preencher Nova Ficha

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: **“CARACTERIZAÇÃO DA COINFECÇÃO LEISHMANIA/HIV EM PACIENTES ATENDIDOS EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO MARANHÃO: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS”**

O Sr(a). está sendo convidado(a) pela Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo (CRM-MA: 2415), médica pesquisadora da Universidade Federal do Maranhão, a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto visa investigar o quadro clínico, alterações laboratoriais e evolução após o início do tratamento da Leishmaniose Visceral em associação com o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV). Sabe-se que a Leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Calazar, tem uma evolução mais grave quando associada ao HIV e que a resposta ao tratamento pode está comprometida, assim a recaída é mais comum neste grupo de pacientes.

Você responderá algumas perguntas relacionadas aos sintomas associados a LV e ao HIV, além de dados pessoais (idade, sexo, profissão, nível de escolaridade, cidade de nascimento e de residência). Também acompanharei sua evolução, durante o tratamento e após término do tratamento, por um período de 2 (dois) anos. Coletarei os dados de exame físico e exames laboratoriais que estão no seu prontuário. Compreenda que o objetivo principal desta pesquisa é avaliar a LV, analisar a forma clínica, gravidade da doença e se está ocorrendo uma melhora no seu quadro clínico a partir do tratamento que você utilizará e se manterá cura após 2 anos do tratamento da LV.

Os principais benefícios esperados são entender a apresentação clínica e as prováveis evoluções nesta co-infecção (LV/HIV), o que pode vir a reduzir as complicações, comuns a estas doenças. Também se espera que com a avaliação das apresentações clínicas, da resposta terapêutica e evolução pós tratamento, bem como todas as alterações de exames laboratoriais, pode-se aumentar o conhecimento sobre a co-infecção e melhorar o manejo desta doença. Esta pesquisa não oferece nenhum risco para sua saúde, visto que não irei interferir em seu tratamento, apenas irei acompanhá-lo, durante o período previsto. Os riscos a que estará sujeito serão

com relação a quebra de sigilo ou sentir-se constrangido em responder a questionamentos sobre sua doença, mas asseguro o sigilo do seu diagnóstico e tudo será feito de acordo com sua vontade para que se sinta bem durante a entrevista.

Afirmo que você não é obrigado a participar do estudo e que isso não trará nenhum prejuízo ao Sr(a). ou seus familiares. Explico que não receberá nenhum pagamento por participar da pesquisa, e que se participar, tem o direito de desistir a qualquer momento. Garantimos que as informações dadas ao projeto permanecerão em sigilo durante todas as etapas desta pesquisa, inclusive na publicação dos resultados da mesma.

Também afirmo que poderá solicitar qualquer esclarecimento ou fazer qualquer reclamação com a Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo ou outro membro de sua equipe, pessoalmente ou pelos telefones (98) 30821193, (98) 88036918. Também forneço o telefone do CEP (Comitê de Ética na Pesquisa), para que possa fazer qualquer reclamação ou tirar dúvidas sobre questões éticas relacionadas à pesquisa. Tel: (98)21091250.

Este documento estará em duas vias, assinadas e rubricadas pelo pesquisador responsável e pelos voluntários da pesquisa, ficando uma via com o pesquisador e a outra com o voluntário.

Por fim, após ler esse documento, pode solicitar qualquer explicação que deseje da equipe, e caso não possua mais dúvidas, concorda em participar como voluntário do projeto e estudo agora proposto, o que fica confirmado pela sua assinatura abaixo.

(Local), de de 202_____

NOME:

Assinatura:_____

IMPRESSÃO DATILOSCÓPICA (quando se aplicar)

TESTEMUNHAS:

1. NOME:.....

Assinatura: _____

1. NOME:.....

Assinatura: _____