

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

WALTER LINS BARBOSA JÚNIOR

**ESTUDO DE FATORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS ENVOLVIDOS NA
SUSCEPTIBILIDADE A LEISHMANIOSE VISCERAL EM PACIENTES
COINFECTADOS COM HIV**

RECIFE

2019

WALTER LINS BARBOSA JÚNIOR

**ESTUDO DE FATORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS ENVOLVIDOS NA
SUSCEPTIBILIDADE A LEISHMANIOSE VISCERAL EM PACIENTES
COINFECTADOS COM HIV**

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Doutor de Ciências.

Orientadora:

Dr.^a Zulma Maria de Medeiros

Coorientadores:

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Dr. Fábio Lopes de Melo

Recife

2019

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- B238e Barbosa Júnior, Walter Lins.
Estudo de fatores genéticos e epigenéticos envolvidos na susceptibilidade a leishmaniose visceral em pacientes coinfectados com HIV / Walter Lins Barbosa Júnior. -- Recife: [s.n.], 2019.
121 p. : il.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.
Orientadora: Zulma Maria de Medeiros; coorientadores: Luydson Richardson Silva Vasconcelos, Fábio Lopes de Melo.
1. Fatores genéticos. 2. Polimorfismos. 3. Citocinas. 4. MicroRNAs. 5. Leishmaniose visceral – complicações. 6. Infecções por HIV – complicações. I. Medeiros, Zulma Maria de. II. Vasconcelos, Luydson Richardson Silva. III. Melo, Fábio Lopes de. IV. Título.

WALTER LINS BARBOSA JÚNIOR

**ESTUDO DE FATORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS ENVOLVIDOS NA
SUSCEPTIBILIDADE A LEISHMANIOSE VISCERAL EM PACIENTES
COINFECTADOS COM HIV**

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Doutor de Ciências.

Data da aprovação: 01/11/2019

Banca Examinadora

Dr.^a Zulma Maria de Medeiros

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr.^a Clarice Neuenschwander Lins de Moraes

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Christian Robson de Souza Reis

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Franklin Barbalho Magalhães

Associação Caruaruense de Ensino Superior

Dr.^a Taciana Furtado de Mendonça Belmont

Universidade de Pernambuco

À minha família, aos meus pais e aos amigos pela
compreensão e apoio incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, por iluminar meus caminhos e proporcionar a conclusão de mais uma etapa da vida.

À minha família, aos meus pais, Walter e Ivana, minha avó, meus tios e primos pelo conforto, apoio em todas as decisões e ajuda nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora Zulma Medeiros, pela confiança, por acreditar em meu potencial e por proporcionar o meu desenvolvimento científico.

Ao meu orientador Luydson Vasconcelos, pela confiança, pela paciência e pelos ensinamentos que estimulam o meu desenvolvimento profissional.

Ao meu orientador Fábio Melo, pela confiança, por todo o apoio e pelas nossas conversas, que tanto estimulam e desenvolvem o meu pensamento crítico.

Aos meus colegas do departamento de Parasitologia e do laboratório: Elis, Cynthia, Patrícia, Amanda Xavier, Amanda Vieira, Raul, Kleyton, Mércia, Morgana, Diego, Ellyda, Gilberto, Alda, Rhaíssa, Leandro, Gabi, Edeneide, Ana Carla, Pablo, Ana Emília, Sarah Lacerda, Júlia, Maria Eduarda, Sara Maria, Arthur, Luiz, Paulo, Ana Maria, Almerice e André por toda ajuda, pelos momentos compartilhados durante todo esse processo e pela amizade.

Aos meus amigos da pós-graduação, em especial à Rayana Morais, pelos momentos compartilhados durante esses quatro anos.

A todos os meus amigos de curso de Biologia, em especial à Raquel, Maria Helena, Karla e Lucas pelo convívio, pelo carinho e união. Por tornarem os quatro anos de graduação tão prazerosos.

Aos professores da pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, por serem profissionais exemplares e por me proporcionarem o aprendizado.

Aos alunos e aos colegas professores da UFPE, da UPE e da UNIVISA, por tornarem a experiência da docência prazerosa.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, instituição financiadora, e a FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, onde desenvolvi minhas atividades de pesquisa como bolsista.

Agradeço não só aqueles que me ajudaram diretamente no trabalho, mas também aqueles que, de alguma forma, entraram na minha vida e me deram forças, me fizeram seguir em frente e, portanto, me engrandeceram de alguma forma.

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... E a vida é muito para ser insignificante. ”

(Charles Chaplin)

BARBOSA JÚNIOR, Walter Lins. **Estudo de fatores genéticos e epigenéticos envolvidos na susceptibilidade a leishmaniose visceral em pacientes coinfectados com HIV**. 2019. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

A coinfeção leishmaniose visceral (LV)/HIV é uma doença grave e letal. O estudo dos polimorfismos genéticos, dosagem de citocinas e expressão de miRNAs são importantes na compreensão da doença, principalmente no aspecto imunogenético. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar polimorfismos genéticos, dosagem de citocinas (Th1/Th2) e expressão dos miRNAs na coinfeção. Um estudo transversal foi desenvolvido com grupos de comparação: LV/HIV e HIV. Os indivíduos HIV foram submetidos ao diagnóstico laboratorial da LV, sendo também empregados métodos de tipagem genética na caracterização molecular da espécie *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Foram analisados DNAs extraídos de sangue total (110 LV/HIV e 199 HIV): polimorfismos nos genes [*SLC11A1* (rs3731865), *LECT2* (rs248158, rs2526146, rs2526152, rs30740, rs4976360), *CCL1* (rs159271, rs159273), *CCL16* (rs2063979, rs854680) e *IL4* (rs2070874)]; e dosagem sérica (65 LV/HIV e 48 HIV): citocinas (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10) e miRNAs (mir182, mir210 e mir122). Entre todos os SNPs estudados, os modelos genéticos dominante ($p=0,0206$, OR 1,8126, IC 95% 1,1050-2,9727) e alélico ($p=0,0347$, OR 1,5645, IC 95% 1,0307-2,3747) confirmaram associação do polimorfismo do gene *SLC11A1* (rs3731865) à coinfeção. Cinco SNPs de *SLC11A1* (rs6734861, rs13011285, rs17228995, rs2276631, rs2290708), proximais ao rs3731865, estavam em desequilíbrio de ligação ($r^2>0,6$). Na análise multivariada, a susceptibilidade à LV/HIV foi associada ao T CD4+ ($p=0,0030$, OR 0,9980, IC 95% 0,9970-0,9990) e o genótipo GG em *SLC11A1* ($p=0,0050$, OR 3,0395, IC 95% 1,4065-6,5789), com o alelo G considerado fator de risco. Nas análises de correlação, as citocinas obtiveram correlação positiva entre si, com níveis séricos de TNF e IL-4 ($p<0,0001$ cada) mais elevados no LV/HIV. IL-4 foi relacionada à carga viral no grupo LV/HIV ($r=0,46$) e o miR-182 estava mais expresso no HIV ($p=0,009$). Assim, o polimorfismo do gene *SLC11A1* (rs3731865) foi associado à LV/HIV, sugerindo a existência de um mecanismo genético envolvido na susceptibilidade para LV em pacientes HIV. Destaca-se o papel de TNF, IL-4 e o miR-182 como prováveis biomarcadores séricos na coinfeção. Dessa forma, os resultados apresentados são fundamentais para a compreensão do papel da imunogenética no desenvolvimento da coinfeção LV/HIV.

Palavras-chave: Fatores genéticos. Polimorfismos. Citocinas. MicroRNAs. Coinfeção LV/HIV

BARBOSA JÚNIOR, Walter Lins. **Study of genetic and epigenetic factors involved in the susceptibility to visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients.** 2019. Thesis (PhD's Program in Biosciences and Biotechnology in Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL)/HIV co-infection is a serious and lethal disease. Genetic polymorphism studies, cytokine dosage and miRNA expression are important to understand the disease, mainly in the immunogenetic aspect. Thus, the aim of this study was to investigate genetic polymorphisms, cytokine dosage (Th1/Th2) and miRNA expression in co-infection. A cross-sectional study was conducted with comparison groups: VL/HIV and HIV. HIV individuals were submitted to laboratory diagnosis of VL, and genetic typing methods were also performed to molecular characterization of *Leishmania (L.) infantum chagasi* specie. Whole blood extracted DNAs (110 VL/HIV and 199 HIV) were analyzed: polymorphisms in the genes [*SLC11A1* (rs3731865), *LECT2* (rs248158, rs2526146, rs2526152, rs30740, rs4976360), *CCL1* (rs159271, rs159273), *CCL16* (rs2063979, rs854680) and *IL4* (rs2070874)]; and serum dosage (65 VL/HIV and 48 HIV): cytokines (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6 and IL-10) and miRNAs (mir182, mir210 and mir122). Among all SNPs studied, the dominant ($p = 0.0206$, OR 1.8126, 95% CI 1.1050-2.9727) and allelic ($p = 0.0347$, OR 1.5645, 95% CI 1.0307-2.3747) genetic models confirmed association of the *SLC11A1* (rs3731865) polymorphism with co-infection. Five *SLC11A1* SNPs (rs6734861, rs13011285, rs17228995, rs2276631, rs2290708), proximate to rs3731865, were in linkage disequilibrium ($r^2 > 0.6$). In multivariate analysis, susceptibility to VL/HIV was associated with CD4 + T ($p = 0.0030$, OR 0.9980, 95% CI 0.9970-0.9999) and GG genotype in *SLC11A1* ($p = 0.0050$, OR 3.0395, 95% CI 1.4065-6.5789), with the G allele considered as a risk factor. In correlation analyzes, cytokines were positively correlated with higher serum levels of TNF and IL-4 ($p < 0.0001$ both) in VL/HIV. IL-4 was related to viral load in the VL/HIV group ($r = 0.46$) and the miR-182 was over expressed in HIV ($p = 0.009$). Therefore, the *SLC11A1* polymorphism (rs3731865) was associated with VL/HIV, suggesting a possible genetic mechanism involved in susceptibility to VL in HIV patients. We highlight the role of TNF, IL-4 and miR-182 as possible serum biomarkers in co-infection. This way, the results presented herein are fundamental for understanding the role of immunogenetics in the VL/HIV co-infection development.

Keywords: Genetic factors. Polymorphisms. Cytokines. MicroRNAs. VL/HIV co-infection

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho Mundo e no Novo Mundo.	17
Figura 2	Distribuição cumulativa dos casos de leishmaniose visceral notificados em Pernambuco, Brasil.	19
Figura 3	Áreas com sobreposição da coinfeção leishmaniose/HIV no mundo.	21
Figura 4	Fêmea do vetor (<i>Lutzomyia longipalpis</i>) responsável pela transmissão da leishmaniose visceral na América Latina.	22
Figura 5	Ciclo de vida do gênero <i>Leishmania</i> .	22
Figura 6	Imunologia da resistência e da susceptibilidade à coinfeção leishmaniose visceral/HIV.	31
Figura 7	SLC11A1 regula a via de ativação de macrófagos.	34
Figura 8	LECT2 regula mediadores inflamatórios, a indução de NOS e COX-2.	36
Figura 9	CCL1 e CCL16 regulam citocinas relacionadas à leishmaniose visceral.	37
Figura 10	IL-4 regula resposta humoral e adaptativa.	39
Figura 11	Influência do miR-210 nos mecanismos de apoptose.	42
Figura 12	GP63 bloqueia o metabolismo do colesterol através da clivagem da enzima DICER1.	43
Quadro 1	Definição de casos de LV/HIV.	49
Figura 13	Fluxo de atividades com direcionamento de amostras para os ensaios de genotipagem de SNPs, dosagem de citocinas e de expressão de miRNAs.	50
Quadro 2	Polimorfismos genéticos de <i>SLC11A1</i> , <i>LECT2</i> , <i>CCL1</i> , <i>CCL16</i> e <i>IL4</i> .	51
Quadro 3	Limite de detecção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO2	Proteína argonauta 2
AKT	Proteína quinase B
APTX	Aprataxin
CCL	Cysteine-cysteine chemokine ligands
CCR	Cysteine-cysteine chemokine receptor
CEP	Comitê de ética em pesquisa
COX-2	Ciclooxigenase-2
Ct	Comparative cycle threshold
DAT	Teste de aglutinação direta
DGCR8	Digeorge syndrome chromosomal region 8
DICER	Endoribonuclease Dicer
DROSHA	Drosha ribonuclease III
ELISA	Ensaio imunoenzimático
HIF-1α	Fator indutor de hipóxia 1-alfa
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMGCαA	Hidroximetilglutaril Coenzima A
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INT	Íntron
ITS1	Epaçador interno transcrito 1
kDNA	DNA do cinetoplasto
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTH+	Delayed-type hypersensitivity
LD	Linkage disequilibrium
LECT2	Leukocyte cell-derived chemotaxin 2
LIT	Liver Infusion Triptose
LT-alfa	Linfotoxina alfa
LTC	Linfócito T citotóxico

LTBP4	Latent transforming growth factor beta binding protein 4
LV	Leishmaniose visceral
LXR	Fator de transcrição do receptor hepático X
miRNA	MicroRNA
NIH	National Institutes of Health
NNN	Novy-Mcneal-Nicolle
NOS	Óxido nítrico sintase
OR	Odds ratio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGs	Prostaglandinas
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase
PIP2/3	Fosfatidilinositol bifosfato/trifosfato
TARV	Terapia altamente eficaz com antirretrovirais
TCR	Receptor de célula T
TNF	Fator de necrose tumoral
TMEM215	Proteína transmembrana 215
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	Linfócito T auxiliar
Treg	Linfócito T regulador
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RISC	Complexo de indução do silenciamento do RNA
rK39	Proteína recombinante cinesina 39
RNA	Ácido ribonucleico
RTK	Receptor tirosina quinase
SLC11A1	Solute carrier family 11 member 1
SNP	Single nucleotide polymorfisms
STR	Small tandem repeats
UTR	Região não traduzida
VNTR	Variable number of tandem repeats

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	17
2.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral e coinfeção leishmaniose visceral/ HIV-aids.....	17
2.2 Aspectos clínicos da coinfeção LV/HIV-aids.....	21
2.3 Diagnóstico laboratorial.....	24
2.3.1 Exames parasitológicos	24
2.3.2 Diagnóstico imunológico.....	25
2.3.3 Métodos moleculares.....	27
2.4 Susceptibilidade/resistência à leishmaniose visceral	29
2.5 Os polimorfismos genéticos	31
2.6 Genes envolvidos na imunopatogênese das formas clínicas da leishmaniose visceral (<i>SLC11A1</i>, <i>LECT2</i>, <i>CCL1</i>, <i>CCL16</i> e <i>IL4</i>)	32
2.7 MicroRNAs como fatores epigenéticos relacionados à leishmaniose visceral	39
2.7.1 miR-182.....	40
2.7.2 miR-210	41
2.7.3 miR-122.....	42
3 JUSTIFICATIVA	44
4 PERGUNTA CONDUTORA.....	45
5 HIPÓTESE.....	46
6 OBJETIVO GERAL	47
6.1 Objetivos específicos.....	47
7 MÉTODO	48
7.1 Área de estudo	48
7.2 Caracterização dos grupos	48
7.3 Definição dos casos	48
7.4 Tamanho amostral	49
7.5 Desenho do estudo	50
7.6 Coleta de dados clínico-laboratoriais	50
7.7 Ensaio.....	50
7.7.1 Detecção dos polimorfismos	50
7.7.2 Dosagem de citocinas	51

7.7.3 Extração de RNA.....	52
7.7.4 Ensaio de expressão de miRNAs	52
7.8 Plano de tabulação e análises estatísticas dos dados	53
7.9 Considerações éticas.....	53
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
8.1 Artigo 1: Characterization of <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> in visceral leishmaniasis associated with hiv co-infection in Northeastern Brazil	55
8.2 Artigo 2: <i>SLC11A1</i> (rs3731865) polymorphism and susceptibility to visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients from Northeastern Brazil	61
8.3 Artigo 3: Higher serum levels of TNF and IL-4 cytokines and low miR-182 expression in VL-HIV co-infected patients.....	83
9 CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS.....	105
ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES.....	121

1 INTRODUÇÃO

A coinfeção leishmaniose visceral/HIV (LV/HIV) é uma doença grave, cujo desenvolvimento das formas clínicas sintomáticas (típica e atípica) e assintomáticas podem ser influenciadas pela idade, estado nutricional e fatores imunogenéticos do hospedeiro, sendo consideradas importantes variáveis relacionadas à susceptibilidade à doença (JERONIMO *et al.*, 2007a).

O papel dos fatores genéticos para LV no hospedeiro foi destacado a partir de estudos de escaneamento total de genomas, cujo produto do gene *SLC11A1*, uma proteína integral de membranas, apresenta relação com a via de ativação de macrófagos. O polimorfismo deste gene está localizado no cromossomo 2q35, íntron 4 (469 +14G/C) (rs3731865). Já o gene *LECT2* codifica proteínas que apresentam função quimiotática para neutrófilos. Os polimorfismos deste gene estão localizados no cromossomo 5q31.1 (rs248158, rs2526146, rs2526152, rs30740 e rs4976360). Os produtos dos genes *CCL1* e *CCL16* estão relacionados à atividade quimiotática para monócitos e a supressão da proliferação de células progenitoras mielóides. Os polimorfismos destes genes estão localizados no cromossomo 17q11.2-q23.3, sendo o *CCL1* (rs159271 e rs159273) e *CCL16* (rs2063979 e rs854680). O gene *IL4* codifica uma citocina anti-inflamatória, apresentando polimorfismos funcionais localizados na região promotora do cromossomo 5q31-33 (rs2070874) (BLACKWELL *et al.*, 2009; JAMIESON *et al.*, 2007; JERONIMO *et al.*, 2007a; MISHRA *et al.*, 2014).

Polimorfismos nos genes *SLC11A1* e *IL4* foram relacionados à infecção pelo HIV e também a susceptibilidade à LV. Nos indivíduos imunodeprimidos e nos imunocomprometidos, como nos casos de infecção por HIV, a leishmaniose visceral é considerada uma infecção oportunista e com maior risco para recidiva. Desde o primeiro relato de caso de leishmaniose humana associada ao HIV, tem sido registrado um aumento nos casos de coinfeção, totalizando 35 países com casos detectados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007). No Brasil, esta associação também tem sido descrita de maneira crescente (COTA *et al.*, 2014). Dessa forma, são necessários estudos que associem os fatores genéticos em genes da imunidade relacionados a susceptibilidade à coinfeção LV/HIV, pois sabe-se que esses fatores imunogenéticos envolvem elementos da imunidade humoral e celular contra as proteínas virais e de *Leishmania* que atuam no controle da coinfeção (EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010).

Além de polimorfismos genéticos, uma classe de RNAs não codificantes (miRNAs), relacionada ao controle epigenético, exerce um importante papel na regulação gênica. Os miRNAs afetam as vias celulares, associadas às respostas imune inata e adaptativa, conferindo

adaptabilidade às células em resposta aos patógenos. O miR-182 é considerado uma molécula reguladora da resposta Th1/Th2 para doenças parasitárias (KELADA *et al.*, 2013; STUMPFOVA *et al.*, 2014). No entanto, o miR-210 regula as vias relacionadas à apoptose durante a infecção por *Leishmania* (LEMAIRE *et al.*, 2013). Por sua vez, *L. donovani* suprime a transcrição de miR-122, favorecendo a redução dos níveis de colesterol em macrófagos murinos, e assim prejudicando a apresentação de antígenos ocasionada pelo aumento da fluidez das membranas (GHOSH *et al.*, 2013).

Os estudos dos fatores genéticos do hospedeiro tornam-se essenciais para a compreensão das respostas imunes inata e adaptativa no curso da infecção. Devido as informações referentes aos fatores genéticos envolvidos na coinfeção leishmaniose visceral/HIV (LV/HIV) serem restritas na literatura, são necessários estudos que explorem tanto os polimorfismos genéticos, dosagem de citocinas e a expressão de miRNAs, visando a compreensão do efeito genético e epigenético para o desenvolvimento da coinfeção.

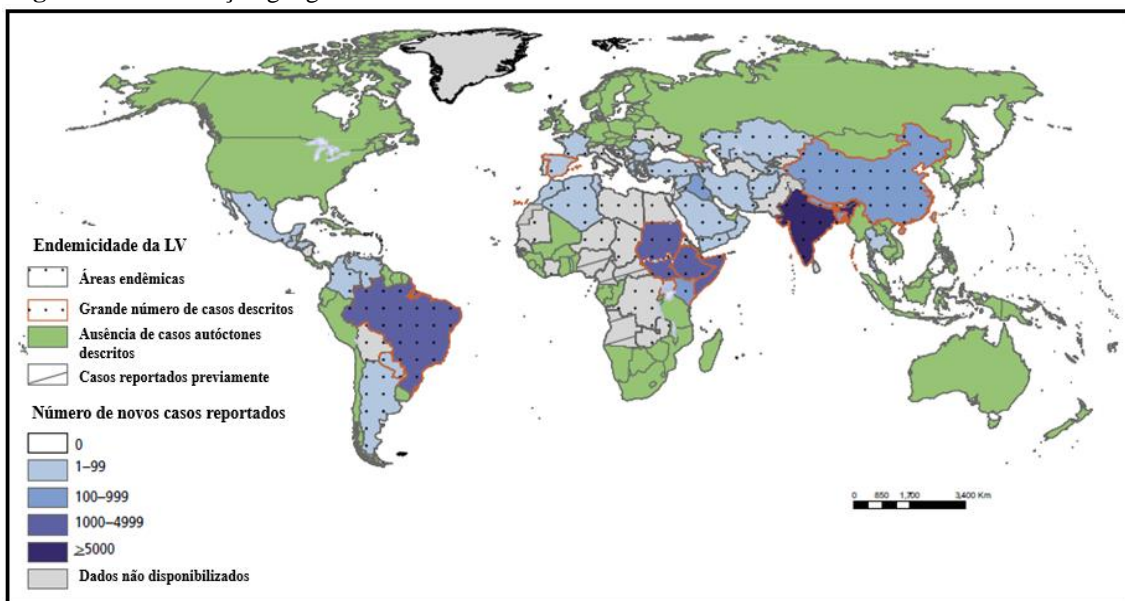
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

A Leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma parasitose crônica grave causada por protozoários unicelulares e digenéticos (heteróxeos) das espécies *Leishmania (L.) chagasi*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* (NEVES, 2012). A definição de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* como sinônimas é a mais adotada, devendo ser utilizada até que uma nova classificação para o gênero *Leishmania* seja proposta. A nomenclatura utilizada para descrever a espécie responsável pela LV nas Américas é *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) (DANTAS-TORRES, 2006; LUKES *et al.*, 2007; MAURICIO *et al.*, 2000).

2.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral e coinfeção leishmaniose visceral/HIV-aids

O calazar é endêmico em 75 países (Figura 1), presente em quatro continentes. As áreas rurais pobres do leste da África (Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Somália), sul da Ásia (Índia e Bangladesh), e América Latina (Brasil) representam os principais pontos de notificação para a doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016).

Figura 1 - Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho Mundo e no Novo Mundo.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2016, tradução nossa).

Nota: As áreas com coloração azul escura pontilhadas destacam países com mais de 1000 novos casos reportados para LV no ano de 2016.

É considerada doença tropical negligenciada, com distribuição mundial principalmente nas zonas tropicais e subtropicais, sendo registrados entre 50.000-90.000 novos casos da LV

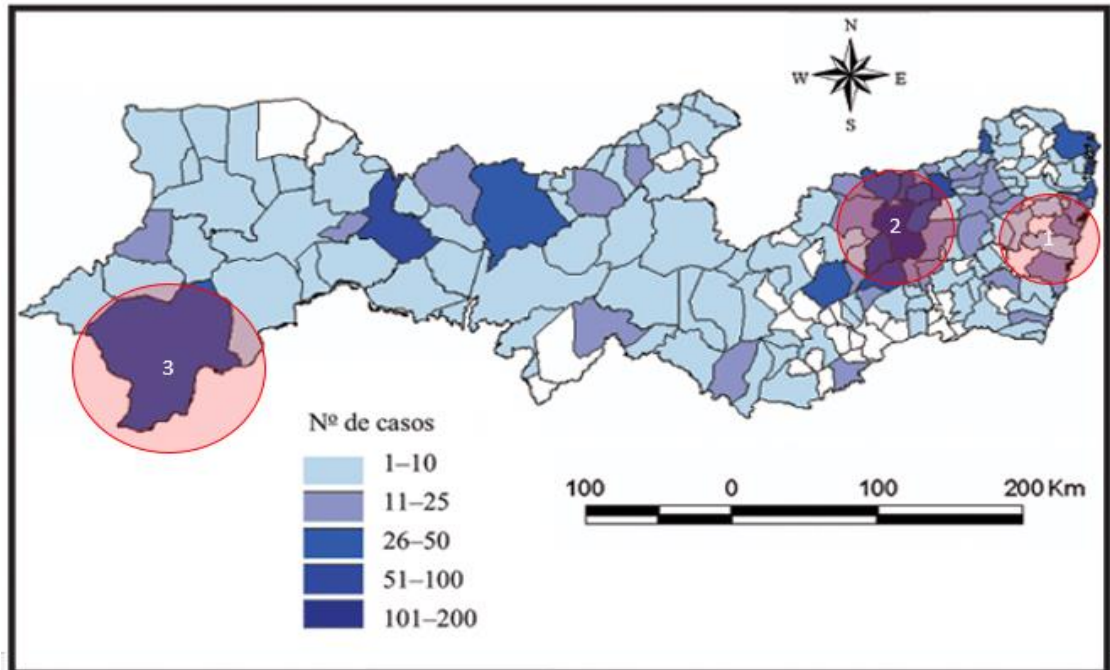
por ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016). Entre as doenças negligenciadas, a LV possui nível III de prioridade para Organização Mundial de Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007).

Na América Latina, o Brasil destaca-se por possuir a maior endemicidade, apresentando casos notificados em 21 unidades da federação, estando a doença em expansão nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste. A região Nordeste do Brasil possui 53,6% das notificações do país (BRASIL, 2011). No país, a importância da LV reside não somente na sua alta incidência, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais, quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes, atingindo principalmente pessoas que vivem em situações socioeconômicas precárias (ALVARENGA *et al.*, 2010; DESJEUX, 2004). A manifestação da forma típica da doença acomete pessoas de todas as idades, tornando-se mais frequente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos (SILVA, Eduardo *et al.*, 2001). Proporcionalmente, o sexo masculino é o mais afetado e, em alguns focos urbanos estudados, existe a tendência de modificação na distribuição dos casos por grupo etário, com ocorrência de altas taxas também no grupo de adultos jovens (BRASIL, 2014; SILVA, Eduardo *et al.*, 2001).

Segundo Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006) houve uma expansão da distribuição geográfica da LV no estado de Pernambuco entre os anos de 1999 e 2000, com registro de casos em 119 municípios, abrangendo praticamente todo o território pernambucano. No entanto, o Sertão apresenta grande concentração dos casos, superando os números registrados no Agreste e na Região Metropolitana do Recife (DINIZ; SOUZA; CARMO, 2018) (Figura 2).

Casos de LV foram notificados, a partir de 1979, em decorrência de processos patológicos, de doenças inflamatórias crônicas e terapias imunossupressoras relacionadas às doenças autoimunes ou transplantes de órgãos. Em diferentes partes do mundo também foram relatados casos de LV durante a infecção pelo HIV-aids (DEDET; PRATLONG, 2000).

Figura 2 – Distribuição cumulativa dos casos de leishmaniose visceral notificados em Pernambuco, Brasil.



Fonte: Adaptado de Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006).

Legenda: 1- Região Metropolitana do Recife, 2 – Caruaru, 3 – Petrolina.

Nota: Os círculos vermelhos representam áreas de endemicidade para LV em Pernambuco.

O primeiro relato de caso de leishmaniose humana associado com o HIV foi descrito no sul da Europa por Loma et al. (1985) e a partir disto, dados estatísticos destacaram 33 países notificados para a coinfeção LV/HIV-aids até 1998, dos quais a Espanha, Itália, França e Portugal representavam 85% dos 1700 casos primariamente reportados no continente europeu. A infecção pelo HIV pode reativar a infecção latente por *Leishmania* spp., aumentando o nível de transmissão nos ciclos zoonótico e antroponótico, que facilita a transmissão artificial de *Leishmania* spp. (transmissão humano-humano), sendo por transfusão sanguínea; por transplante de órgãos e por via percutânea, principalmente entre usuários de drogas injetáveis, consolidando o ciclo antroponótico na região do Mediterrâneo (MOLINA *et al.*, 2003).

O aumento no número dos casos de coinfeção tem sido registrado progressivamente, totalizando 35 países (Figura 3) com casos detectados (CRUZ *et al.*, 2006; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007). Este aumento no número de casos de coinfeção surge da sobreposição com a epidemia de aids, principalmente em áreas onde a LV é endêmica, pelo fato da infecção pelo HIV aumentar o risco do desenvolvimento da LV de 100-1000 vezes. Mudanças epidemiológicas, tais como o aumento da população em zonas suburbanas, onde o vetor e o reservatório são abundantes, aumentaram esta sobreposição (CRUZ *et al.*, 2006). A LV acelera a progressão do HIV para a condição da aids devido à depleção de linfócitos T CD4,

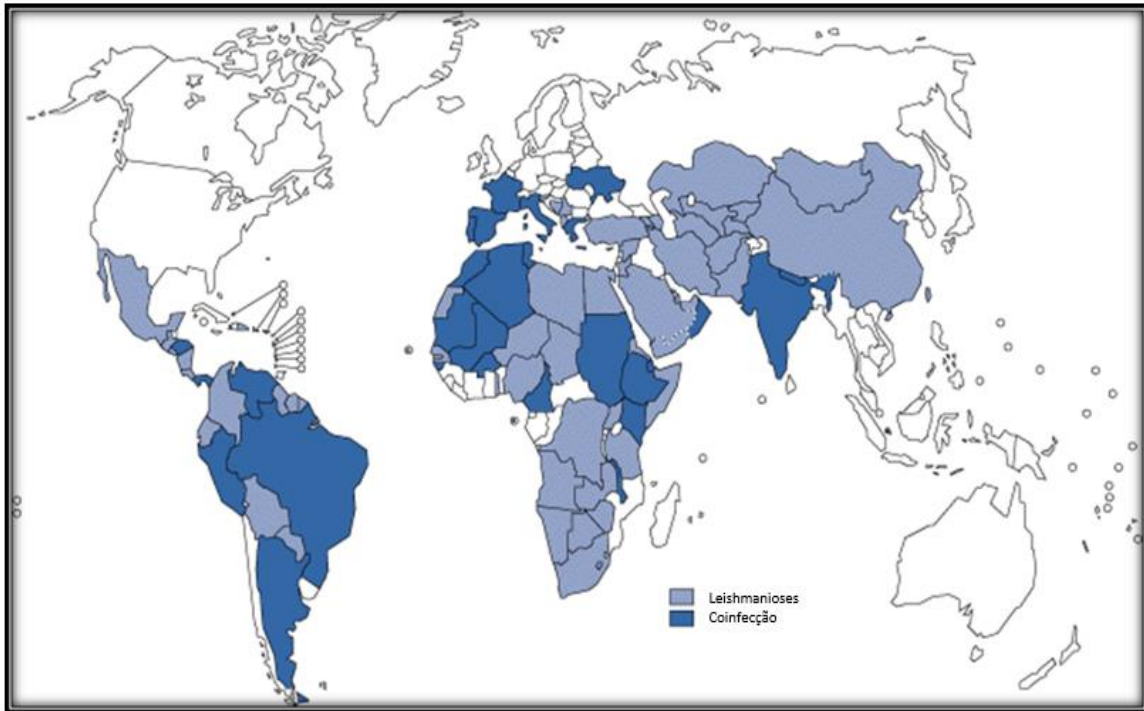
o que aumenta a letalidade em cinco vezes (DRUZIAN *et al.*, 2015; PINTADO; LOPES-VELEZ, 2001). Uma justificativa plausível para o estabelecimento da aids é que as formas amastigotas de *Leishmania* spp. podem induzir a replicação viral durante a infecção dos macrófagos (CRUZ *et al.*, 2006; GUERIN *et al.*, 2002).

No mundo, cinco a seis por cento do total de casos da coinfeção LV/HIV ocorrem no Mediterrâneo (MONGE-MAILLO *et al.*, 2014). No entanto, em algumas áreas da Etiópia, 35% dos pacientes com leishmanioses apresentavam o HIV, que vem se difundindo para países vizinhos, como o Sudão (DIRO *et al.*, 2014). Na Índia, a prevalência da coinfeção aumentou de 0,88% no ano 2000, para 2,18% em 2006 (SINGH, 2014). Na América, países como México, Argentina, Paraguai e Venezuela vêm reportando novos casos de coinfeção LV/HIV (LINDOSO *et al.*, 2014).

No Brasil, esta associação também tem sido descrita de maneira crescente, 0,7% em 2000 para 8,5% em 2012, sendo o país que apresenta aproximadamente 93% dos casos coinfeção da América Latina (EPIDEMIOLOGICAL REPORT OF THE AMERICAS. LEISHMANIASES, 2019). Estudos brasileiros referentes à coinfeção estão concentrados em artigos de revisão e relato de casos (ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2010; BARBOSA JÚNIOR *et al.*, 2015; BERMAN, 2006; BORGES *et al.*, 1999; CALICH *et al.*, 1991; CARNAUBA *et al.*, 2009; CARRANZA-TAMAYO *et al.*, 2009; CAVALCANTI *et al.*, 2012; COTA *et al.*, 2011, 2012, 2013, 2014; DAHER *et al.*, 2009; DIEHL *et al.*, 2004; DRUZIAN *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2001; GUEDES *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2017; LINDOSO *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 1996; MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; MALAFAIA, 2009; ORSINI *et al.*, 2002; RABELLO *et al.*, 2003; SILVA, Eduardo *et al.*, 2002; SILVA, Elis *et al.*, 2013; SOUSA-GOMES *et al.*, 2011; VIANA *et al.*, 1994).

No período de 2001 a 2010, foram confirmados 35.819 casos para LV no Brasil, dos quais 760 apresentavam a coinfeção LV/aids e 541 pela LV/HIV, o que revela o aumento progressivo do número de casos no país (SOUSA-GOMES, 2011). No estado de Pernambuco, essa associação é descrita de maneira crescente, onde Cavalcanti *et al.* (2012) realizaram o primeiro relato em um estudo de avaliação diagnóstica em uma série de casos com pacientes suspeitos da coinfeção. No entanto, Silva *et al.* (2013) relataram o caso de um paciente coinfectado acompanhado durante sete anos, que apresentou múltiplos episódios de recidivas para leishmaniose visceral. Ademais, Barbosa Júnior *et al.* (2015), Lima *et al.* (2017) e Guedes *et al.* (2018) descreveram essa associação nos casos suspeitos a partir da confirmação do diagnóstico de LV juntamente às características clínico-laboratoriais.

Figura 3 - Áreas com sobreposição da coinfeção leishmaniose/HIV no mundo.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2007, tradução nossa).

Nota: Azul claro – distribuição global das leishmanioses; azul escuro – países com casos da coinfeção leishmaniose/HIV reportados.

2.2 Aspectos clínicos da coinfeção LV/HIV-aids

A infecção de LV em pessoas vivendo com HIV-aids pode ocorrer durante a realização do repasto sanguíneo das fêmeas dos flebotomíneos (Figura 4) em um hospedeiro infectado, ao ingerir macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* spp. (LINDOSO *et al.*, 2016). Ao realizar um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (roedores, canídeos, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos, primatas e humanos), o inseto vetor transmitirá as formas promastigotas metacíclicas do parasita, sendo fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocitário (LINDOSO *et al.*, 2016). No interior dos macrófagos, ocorre a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, que irão se multiplicar intensamente até o rompimento das células hospedeiras, levando à liberação das amastigotas que poderão se disseminar pelo sistema vascular e linfático para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea ou ser ingeridas por novos insetos vetores (Figura 5) (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

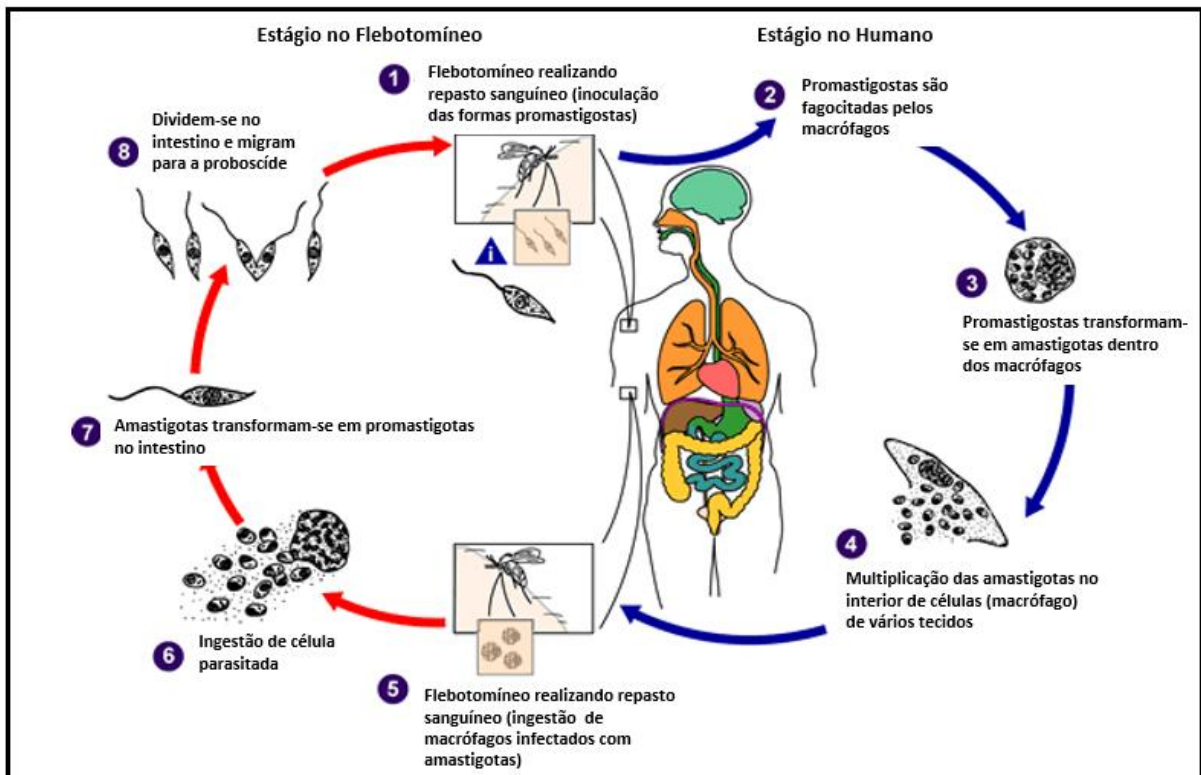
Figura 4 - Fêmea do vetor (*Lutzomyia longipalpis*) responsável pela transmissão da leishmaniose visceral na América Latina.



Fonte: Wikipedia (2013 apud BARBOSA JÚNIOR, 2013).

Nota: Fêmea do flebotomíneo realizando o repasto sanguíneo.

Figura 5 - Ciclo de vida do gênero *Leishmania*.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2013, tradução nossa).

Nota: (1) A fêmea do flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo, inoculando as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* que são fagocitadas pelos macrófagos (2). Posteriormente, as formas promastigotas do parasita tornam-se amastigotas (3), que se multiplicam por divisão binária no interior dos macrófagos (4). O flebotomíneo realiza um repasto sanguíneo (5), ingerindo as células parasitadas (6). As amastigotas transformam-se em promastigotas no intestino médio do inseto vetor (7), que após sucessivas divisões migram para a proboscide tornando-se as formas promastigostas metacíclicas infectantes (8), sendo inoculadas no hospedeiro após um novo repasto sanguíneo.

Uma outra forma de transmissão da parasitose em pessoas imunossuprimidas é pelo uso de drogas endovenosas, sendo o principal fator responsável pela transmissão artificial das formas amastigotas de *Leishmania* spp. nos países do Mediterrâneo. A metaciclologênese de *Leishmania* spp. tem se tornado desnecessária nos países do Mediterrâneo, pelo fato do ciclo antroponótico de transmissão estar consolidado (NUNO-MARQUES *et al.*, 2007; PAREDES *et al.*, 2003).

A apresentação clínica típica da LV, em pessoas vivendo com HIV, pode ser semelhante à forma apresentada pelos indivíduos imunocompetentes. O período de incubação do parasita varia entre 2 a 6 meses, cujos primeiros sinais clínicos são caracterizados pela febre baixa recorrente, com dois a três picos diários, palidez cutâneo-mucosa, acompanhadas da esplenomegalia discreta, mais expressiva que a hepatomegalia, devido ao comprometimento do sistema fagocitário, que pode também desencadear micropoliadenopatia (aumento generalizado dos linfonodos). A fadiga, astenia, perda de apetite e peso são frequentes nesta infecção (BRASIL, 2011; CHAPPUIS *et al.*, 2007; REY, 2011).

Com o avanço da infecção, a distensão abdominal e dor são decorrentes do agravamento da hepatoesplenomegalia, que é acompanhada de citopenias, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia. A tosse, presente em 72% a 81% dos casos, é causada por alterações pulmonares devido à presença de material antigênico de *Leishmania* spp. nos septos alveolares. A glomerulonefrite proliferativa e a nefrite intersticial, quando presentes, são ocasionadas pelo depósito de imunocomplexos circulantes nos rins. Quando a doença atinge o estado crônico, há considerável emagrecimento do indivíduo e aumento da susceptibilidade às infecções secundárias, evoluindo rapidamente para caquexia e morte dentro de algumas semanas ou meses (BRASIL, 2011; COSTA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010). As manifestações clínicas da leishmaniose visceral dependem de um conjunto de fatores que podem estar associados à susceptibilidade a doença, destacando os fatores genéticos do hospedeiro, o ambiente, a carga parasitária e a presença da coinfeção com o HIV (FRADE, 2011; HANDMAN; ELSO; FOOTE, 2005; LINDOSO *et al.*, 2016; SOPHIE *et al.*, 2017).

A avaliação do conjunto de manifestações clínicas da LV, em pacientes vivendo com HIV, indica que não existe um perfil clínico definido que possa ser indiscutivelmente associado com a coinfeção, cujos sintomas podem se manifestar com intensidades variáveis, com o desenvolvimento da forma típica da doença em 75% dos indivíduos infectados (hepatoesplenomegalia, pancitopenia e febre irregular ou intermitente) (CAVALCANTI *et al.*, 2012; LINDOSO *et al.*, 2014; SILVA, Elis *et al.*, 2013). Ademais, a LV surge como infecção oportunista em pacientes com a contagem de linfócitos T CD4⁺ inferior a 200 células/mm³

(ALVAR *et al.*, 1997; CRUZ *et al.*, 2006; DAHER *et al.*, 2009). Estudos sugerem que a terapia altamente eficaz com antirretrovirais (TARV) deve ser administrado para restabelecer parcialmente as funções do sistema imunológico, sendo este ineficiente na prevenção de novos episódios, quando há elevada carga viral (FERNADES COTARELO *et al.*, 2003; LINDOSO *et al.*, 2016; MIRA *et al.*, 2004).

Em decorrência da dificuldade da correlação dos aspectos clínicos e os diagnósticos laboratoriais, a literatura vem descrevendo a infecção de LV como sendo sintomática e assintomática. Os pacientes coinfectados podem apresentar infecção sintomática típica ou atípica de LV (ARONSON *et al.*, 2017; LINDOSO *et al.*, 2016). A doença atípica pode promover acometimento gastrointestinal (estômago, duodeno e cólon), ascites, derrame pleural ou pericárdico, comprometer amígdalas, pode se difundir pela pele, além da possibilidade de disseminação para outras áreas do corpo; assim, as formas amastigotas do parasita podem ser encontradas em locais não usuais, sendo detectáveis em lavagens broncoalveolares, fluidos pleurais ou em biópsia do trato gastrointestinal (ALVAR *et al.*, 1997; LINDOSO *et al.*, 2016; SUNDAR; RAI, 2002). Nos casos de infecção assintomática, cuja proporção é cinco a dez vezes maior que nos indivíduos imunocompetentes, a LV é diagnosticada a partir exames sorológicos positivos, detecção de DNA do parasita em sangue total e/ou presença da reação intradérmica de Montenegro positiva, sendo este fenótipo conhecido como *delayed-type hypersensitivity* (DTH+) (BLACKWELL *et al.*, 2009; LINDOSO *et al.*, 2016; ORTIZ-FLORES *et al.*, 2015).

2.3 Diagnóstico laboratorial

As ferramentas laboratoriais são imprescindíveis para o estabelecimento de um diagnóstico preciso, reduzindo a letalidade e morbidade para LV em pessoas vivendo com HIV-aids (LINDOSO *et al.*, 2016). O diagnóstico de LV é categorizado em três grupos de exames: os exames parasitológicos, os diagnósticos imunológicos e os métodos moleculares. Os métodos adotados no diagnóstico da coinfeção são os mesmos empregados para a definição de LV, ressaltando a importância da associação de informações clínicas e epidemiológicas aos resultados de laboratório (BRASIL, 2011).

2.3.1 Exames parasitológicos

O diagnóstico parasitológico é considerado o “padrão-ouro” no diagnóstico da LV, pelo fato de apresentar elevada especificidade de detecção. Há décadas, a detecção do parasita é

considerada o diagnóstico definitivo para esta doença (SINGH, Dharmendra *et al.*, 2009). A visualização das formas amastigotas em material de biópsia ou punção aspirativa de baço, medula óssea, fígado ou linfonodo torna-se possível em preparações após coloração com Giemsa ou Leishman (BABIKER *et al.*, 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). Os aspirados esplênicos apresentam elevada sensibilidade, porém não são muito utilizados devido à dificuldade técnica e operacional, pois há riscos de hemorragias durante o procedimento de coleta (SUNDAR; RAI, 2002). A punção aspirativa de medula óssea é referência para a definição da LV no Brasil (BRASIL, 2006). O exame tem apresentado baixa sensibilidade no grupo de pacientes coinfectados, sendo o cultivo dos aspirados uma alternativa para aumentar a sensibilidade diagnóstica (DENIAU *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2017; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

A *Leishmania* spp. pode ser isolada em cultivo nos meios NNN (Novy-McNeal-Nicolle), porém nos meios Schneider e LIT (Liver Infusion Triptose) se obtém maior taxa de positividade em menor tempo. As culturas devem ser observadas durante quatro semanas, devendo ser mantidas entre 24-26°C (BRASIL, 2006; SINGH, Sarman 2006).

2.3.2 Diagnóstico imunológico

Além do diagnóstico parasitológico, existem outros métodos para diagnóstico de LV que apresentam boa sensibilidade e especificidade (GONTIJO; MELO, 2004). Os testes sorológicos, baseados na pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos brutos e recombinantes de *Leishmania* spp. têm muito valor no diagnóstico da LV, devido à estimulação de linfócitos B, resultando em hipergamaglobulinemia, que aumenta a produção de anticorpos na LV (GONTIJO; MELO, 2004). Entretanto, existe a possibilidade de falsos resultados positivos, resultantes de reações cruzadas com tripanossomíases, tuberculose e toxoplasmose (SUNDAR; RAI, 2002). Tem-se disponíveis testes com diferentes aplicabilidades, com relação às condições de campo em que são utilizados e na disponibilidade dos reagentes. São eles: o teste de aglutinação direta (DAT), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), os testes rápidos imunocromatográficos e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (SUNDAR; RAI, 2002).

O DAT foi desenvolvido por El Harith *et al.* (1986), sendo um método semiquantitativo de boa sensibilidade e especificidade, que é baseado na reação entre anticorpos na presença de antígenos (promastigotas mortas), tripsinizados, fixados com formalina e corados com azul brilhante. Os soros dos pacientes são diluídos em série, incubados juntamente ao antígeno,

sendo possível visualizar a aglutinação apenas no dia seguinte (SUNDAR; RAI, 2002). Romero e Boelaert (2010) realizaram uma meta-análise com o objetivo de avaliar o desempenho do DAT em pacientes com LV, cujos resultados apresentaram estimativas de sensibilidade e especificidade de 94,8%.

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é uma técnica bastante utilizada desde 1964 para o diagnóstico da LV, principalmente pelos países da América do Sul (COTA; SOUZA; RABELLO, 2011; DUXBURY; SADUN, 1964). Consiste em uma reação antígeno-anticorpo, visualizada com o auxílio de um conjugado, cujos resultados da reação são representados por diluições. Dependendo do antígeno utilizado (*Leishmania* spp. ou preparação antigênica), a sensibilidade pode variar, de 82 a 95% e especificidade de 78 a 92% (MAIA *et al.*, 2012).

O teste imunocromatográfico, rápido e simples, fornecido pela DiaMed IT-LEISH[®] é bastante utilizado para o diagnóstico da LV, baseada na proteína recombinante rK39, que é específica para o complexo *L. donovani*, reagente com o soro ou sangue do paciente. O teste apresenta resultados de sensibilidade entre 98 e 100% em alguns estudos (ASSIS *et al.*, 2008; BURNS *et al.*, 1993). Sundar *et al.* (2003) aplicaram o teste no nordeste da Índia, constatando sensibilidade de 100% e especificidade de 95%. O teste parece ser promissor para uso em programas de saúde pública, pois requer pequena quantidade de sangue periférico, é de rápida execução e leitura (10 minutos) e pode ser utilizado em condições de campo (SINGH, Dharmendra *et al.*, 2009).

O teste de ELISA baseia-se em uma ligação de anticorpos com antígenos brutos solúveis, que é identificada por um conjugado marcado com enzima, de maneira que esta enzima age sobre um substrato e a reação faz com que um reagente cromógeno mude de cor (ASSIS *et al.*, 2008; SUNDAR; RAI, 2002). A técnica apresenta considerável sensibilidade, porém, sua especificidade é dependente do antígeno utilizado. Vários antígenos de *Leishmania* spp. têm sido caracterizados e tecnologias recombinantes têm sido utilizadas, como o ELISA-rk39, para o desenvolvimento de antígenos recombinantes com produção altamente reprodutível, sendo facilmente adaptados para escala industrial e utilizados em ensaios sorodiagnósticos (MAGALHÃES, 2007). Em um estudo realizado com amostras de coinfectados LV/HIV na França, a sensibilidade do teste foi de 81,8%. Os valores de especificidades em 58 amostras do Sudão e da Índia também foram elevados (100% e 96,6%, respectivamente) (ABASS *et al.*, 2015).

Cada teste sorológico tem suas limitações, mas na coinfeção isso é ainda mais pronunciado, sendo recomendada a utilização de mais de um teste sorológico a fim de aumentar

a sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos (COTA *et al.*, 2013; PINTADO; LOPES-VELEZ, 2001). Geralmente encontram-se títulos baixos de anticorpos para *Leishmania* spp. durante a coinfeção, uma vez que a infecção pelo HIV está associada aos distúrbios pronunciados do sistema imunitário, relacionados à ativação de células B policlonais e comprometimento da apresentação de antígenos (ALVAR *et al.*, 2008; DENIAU *et al.*, 2003). Entre estes pacientes, mais de 50% não têm níveis detectáveis de anticorpos para *Leishmania* spp. (ALVAR *et al.*, 1997; MEDRANO *et al.*, 1998). Durante a coinfeção, a resposta humoral e celular para a doença é diminuída, o que aumenta o risco de reativação, levando a maior taxa de falha no tratamento (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Nas tentativas de diagnóstico para LV, tem-se procurado por exames não invasivos, sendo a urina uma boa opção para definição de casos positivos. Um novo teste rápido foi desenvolvido, baseado na aglutinação de partículas de látex recobertas com anticorpos policlonais (KAtex; Kalon Biological Ltd., Aldershot, Hants, United Kingdom) para detecção de um carboidrato antigênico de 5-20 kDa termoestável, de baixo peso molecular, que é excretado na urina de pacientes com LV (SARKARI *et al.*, 2002). A sensibilidade e especificidade alegadas são de 87,2% e de 100%, respectivamente (ATTAR *et al.*, 2001). Riera *et al.* (2004) realizaram um estudo na Espanha aplicando o KAtex, destacando sensibilidade de 85,7% para o teste. O KAtex pode ser utilizado como critério de cura para LV, quando instituída a quimioterapia, devido à redução gradual da antigenúria (ALVAR *et al.*, 2008).

O método de coleta da urina é não invasivo, não causando inconveniências ao paciente. A pesquisa de antígeno na urina é considerada uma técnica promissora, principalmente para pacientes imunodeprimidos, sendo capaz de identificar com maior eficiência as infecções ativas (GAVGANI *et al.*, 2008; SARKARI *et al.*, 2002; SUNDAR *et al.*, 2007).

2.3.3 Métodos moleculares

Desde a década de 80, ferramentas moleculares baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram desenvolvidas para a detecção e identificação precisa dos parasitas do gênero *Leishmania* (GONTIJO; MELO, 2004). Através desse método, o DNA de *Leishmania* spp. pôde ser detectado em grande variedade de amostras biológicas, tais como sangue periférico, soro, urina, aspirados de medula óssea, baço, fígado ou linfonodos (ASSIS *et al.*, 2008). Inúmeros sistemas baseados em PCR nas amostras de sangue periférico e medula óssea têm sido desenvolvidos para *Leishmania* spp., com várias sequências-alvo, juntamente com um

grande número de *primers* desenhados (ARORA *et al.*, 2008). A técnica de PCR torna-se mais sensível quando o alvo a ser amplificado apresenta múltiplas cópias (LACHAUD *et al.*, 2002).

O DNA do cinetoplasto (kDNA) apresenta-se em múltiplas cópias no genoma de *Leishmania* spp., tornando-se um alvo bastante utilizado em ensaios de PCR. O kDNA contém genes que codificam proteínas mitocondriais, assim distribuídos em cerca de 50 maxicírculos com 20.000 a 35.000 pb e 10.000-20.000 minicírculos, com sequencias de 500 a 2500 pb (CORTES, 2008). O espaçador interno transcrito 1 (ITS1) também é um alvo bastante explorado como ferramenta diagnóstica para *Leishmania* spp., localizado na região organizadora nucleolar delimitada pelos genes 18S e o 5.8S, apresentando cerca 100 a 500 cópias no genoma (POLANCO *et al.*, 1998; SCHÖNIAN *et al.*, 2003).

O diagnóstico molecular requer quantidade muito pequena de DNA para detecção do parasita, tendo como vantagens a rapidez na execução, a isenção de interpretação subjetiva e a capacidade de monitoramento terapêutico, sendo assim, vista como uma técnica alternativa, quando o paciente apresenta suspeita clínica, com microscopia e/ou a sorologia negativas ou indeterminadas (ALLAM *et al.*, 2009; NUNO-MARQUES *et al.*, 2007). O método apresenta elevada sensibilidade, acima de 90% e especificidade próxima a 100%, tornando-se adequada para procedimentos de diagnóstico (ASSIS *et al.*, 2008). A PCR detecta mais infecções assintomáticas que o exame direto, devido à elevada sensibilidade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

A PCR em tempo real (qPCR) é uma ferramenta molecular bastante utilizada na pesquisa e diagnóstico de leishmaniose visceral, demonstrado sensibilidade acima de 91,3%, detecção de 0,001 parasitas/ml, e especificidade de 61,82-100% (LACHAUD *et al.*, 2000; LIMA JUNIOR *et al.*, 2013; MARY, 2004; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015). A ferramenta proporciona detecção rápida, sensível e acurada do patógeno, não necessitando manipulação pós-PCR, evitando potenciais contaminações com produtos amplificados, tornando-se promissora para aplicabilidade diagnóstica (CORTES, 2008; PAIVA-CAVALCANTI; REGIS-DA-SILVA; GOMES, 2010).

A PCR tem se tornado uma ferramenta útil para monitorar a eficácia do tratamento, juntamente com a previsão de relapsos em pacientes coinfectados LV/HIV-aids (ANTINORI *et al.*, 2007; CRUZ *et al.*, 2002; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; RIERA *et al.*, 2005). No entanto, a literatura não descreve um protocolo diagnóstico universal baseado em PCR, pois cada grupo de pesquisa otimiza as condições da reação para melhor atender as suas necessidades.

2.4 Susceptibilidade/resistência à leishmaniose visceral

A resposta imune contra *Leishmania spp.* é modulada por vários fatores do hospedeiro, destacando o estado nutricional, idade e herança genética como importantes variáveis que podem influenciar na susceptibilidade/resistência à leishmaniose visceral (BLACKWELL *et al.*, 1997; JERONIMO *et al.*, 2007a). Os fatores genéticos do hospedeiro, o ambiente, interação parasito-hospedeiro, a carga parasitária e a presença da coinfeção LV/HIV são fatores determinantes das diferentes formas clínicas na leishmaniose visceral (FRADE, 2011; HANDMAN; ELSO, FOOTE; 2005; SOPHIE *et al.*, 2017). A partir disso, estudos que descrevem a interação parasito-hospedeiro afirmam que após o repasto sanguíneo do flebotomíneo, o estabelecimento da infecção após a inoculação *Leishmania spp.* é dado pela ação imunomodulatória de moléculas contidas na saliva do vetor, que torna o hospedeiro susceptível à infecção (HANDMAN; ELSO; FOOTE, 2005).

Estudos descrevem o papel dos fatores genéticos na predisposição da infecção pelo HIV, associados a progressão da aids (BARDESKAR; MANIA-PRAMANIK, 2016; LIU *et al.*, 1996). Assim, as pesquisas que relacionam susceptibilidade ao HIV reiteram que os fatores de risco relacionados às relações sexuais (bissexual ou homossexual) e o uso de drogas intravenosas também deverão ser considerados durante a análise de resultados (BARDESKAR; MANIA-PRAMANIK, 2016; DING *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 1996).

Os estudos dos fatores imunológicos envolvidos na susceptibilidade ao HIV apresentam elementos da imunidade humoral e celular contra as proteínas virais e determinantes antigênicos localizados na superfície de células infectadas (EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010). A resposta do linfócito T auxiliar tipo 1 (Th1) é mediada pela imunidade celular, relacionada à produção de interferon gama (IFN- γ), IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18 responsáveis pela indução do linfócito T citotóxico (T CD8⁺); sendo destacada a possibilidade da IL-15 estar associada a degranulação de linfócitos T CD8⁺ após a ligação do antígeno aos respectivos receptores de células T (TCR) (WHITE *et al.*, 2007). A infecção pelo HIV pode alterar o papel das citocinas associadas à resistência e susceptibilidade à LV, podendo resultar em diferentes manifestações clínicas apresentadas na coinfeção LV/HIV (OKWOR; UZONNA, 2013).

Na coinfeção LV/HIV, a coexistência de *Leishmania spp.* e do HIV no interior de macrófagos e células dendríticas influenciam o processamento e a apresentação de antígenos, associadas à produção de moléculas imunomodulatórias, como a cocloxygenase-2 (Cox-2) e a linfotóxina-alfa (LT-alfa), favorecendo a replicação no parasita (ADRIAENSEN *et al.*, 2018; OKWOR; UZONNA, 2013). A resposta imune celular associada a resistência à leishmaniose

visceral é mediada pelo linfócito Th1, com produção de IFN- γ pelos macrófagos, influenciando negativamente a replicação do parasita (BHATTACHARYA; ALI, 2013; EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010). O linfócito Th17 representa um elo entre as respostas imunes inata e adaptativa, sendo associado à proteção contra a LV devido a produção da citocina IL-17, que é responsável pelo recrutamento e ativação de leucócitos, especialmente neutrófilos, além da potencialização da resposta inflamatória Th1 na pele, fígado e baço (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017); entretanto, durante a infecção pelo vírus HIV, há uma redução na população de células Th17 em seus sítios de atuação (ADRIAENSEN *et al.*, 2018). No entanto, a susceptibilidade à LV tem sido relacionada à resposta mediada pelo linfócito Th2, associada ao aumento da produção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e, conseqüentemente, anticorpos associados à imunidade humoral (Figura 6) (BHATTACHARYA; ALI, 2013).

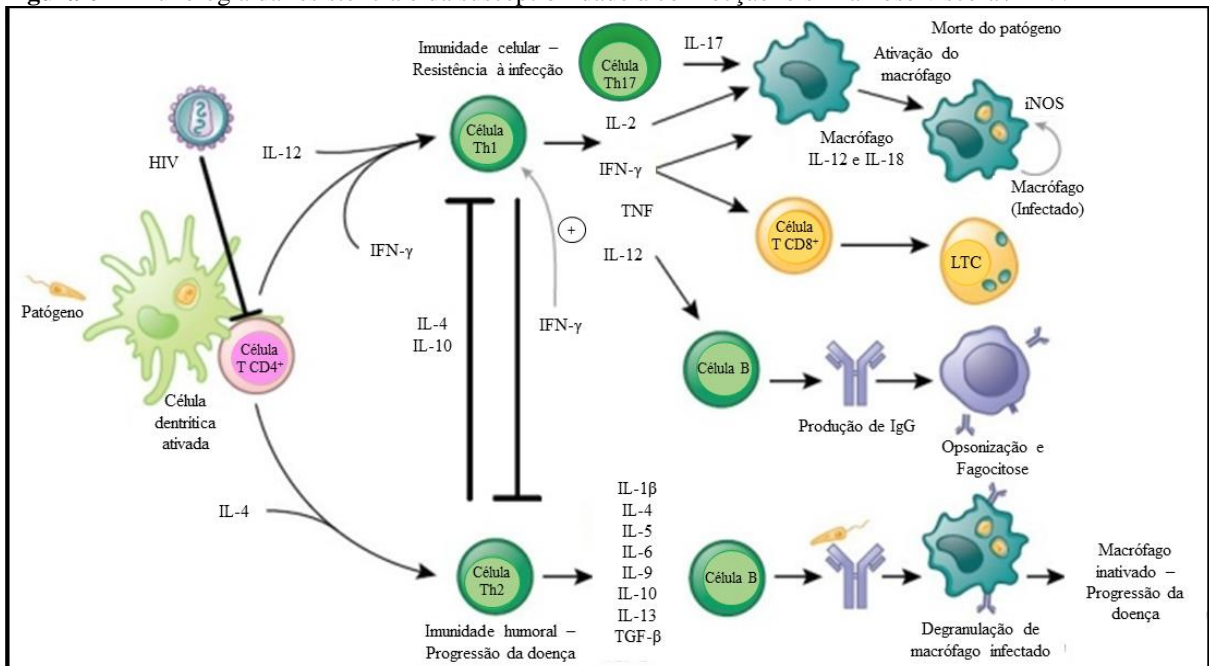
Wolday et al. 1994 destacam que durante a infecção pelo HIV, os níveis de IFN- γ são reduzidos, influenciando negativamente a produção de IL-12 e IL-18, que são importantes para uma resposta Th1 robusta contra *Leishmania* spp. O prognóstico favorável, associado ao sucesso à terapia medicamentosa pode ser relacionado a produção aumentada de IL-15, que na coinfeção LV/HIV desencadeia uma resposta imune protetora contra parasitas intracelulares modulada pela célula T CD8⁺ (D'ETTORRE *et al.*, 2006; MILANO *et al.*, 2002). Em paralelo, a IL-2 estimula a secreção de citocinas pelos linfócitos Th1, Th2 e Th17 e modula a morte celular programada; no entanto, sua síntese é reduzida quando há infecção pelo HIV (ADRIAENSEN *et al.*, 2018). A leishmaniose visceral, durante a coinfeção, pode aumentar a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF, e anti-inflamatórias como a IL-4 e IL-6, que aumentam a viremia, reduzindo o número de células T CD4⁺ (CLERICI *et al.*, 1993; EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010; OKWOR; UZONNA, 2013). A citocina IL-10 inibe a resposta Th1, impedindo a resposta imune mediada pelo TNF durante a LV, podendo evoluir para uma imunossupressão grave em pacientes HIV (COSTA *et al.*, 2013; OKWOR; UZONNA *et al.*, 2013). Ademais, sabe-se que os polimorfismos em genes relacionados à imunidade contra *Leishmania* exercem influência no desfecho clínico da LV (BLACKWELL *et al.*, 2009; EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010; JAMIESON *et al.*, 2007; JERONIMO *et al.*, 2007a; MISHRA *et al.*, 2014).

As pesquisas na área de imunogenética acrescentam novas informações acerca de genes e mecanismos que influenciam a susceptibilidade/resistência à leishmaniose visceral (BLACKWELL *et al.*, 2009; SOPHIE *et al.*, 2017). Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem influenciar muitos fatores de risco associados a doença, sendo selecionados por meio de estudo de genes candidatos diretamente envolvidos na resposta imune do hospedeiro,

associando as diferenças alélicas/genóticas encontradas na população com a susceptibilidade à leishmaniose visceral (FRADE, 2011).

No Brasil, estudos de segregação gênica reiteram a hipótese que os fatores genéticos do hospedeiro estejam relacionados à susceptibilidade a LV e ao fenótipo DTH+ (FEITOSA *et al.*, 1999; PEACOCK *et al.*, 2001). A partir desta hipótese, os estudos que procuram selecionar genes candidatos, associados aos estudos de genoma completo, consolidam cada vez mais informações relacionadas à temática (BLACKWELL *et al.*, 2009; JAMIESON *et al.*, 2007; JERONIMO *et al.*, 2007a). No entanto, os estudos de genes candidatos não proporcionam uma grande cobertura gênica, pelo fato de poucos destes analisarem os fatores genéticos que conferem risco às formas sintomáticas e assintomáticas da LV (WEIRATHER *et al.*, 2017).

Figura 6 – Imunologia da resistência e da susceptibilidade à coinfeção leishmaniose visceral/HIV.



Fonte: Adaptado de Ezra, Ochoa e Craft (2010, tradução nossa).

Nota: A célula dendrítica ativada apresenta os antígenos à célula T CD4+ virgem resultando na diferenciação do linfócito T auxiliar que secreta citocinas relacionadas a resistência à coinfeção LV/HIV (Th1: IFN- γ , TNF, IL-2 e IL-12; Th17: IL-17), resultando na ativação de macrófagos, linfócitos B e linfócito T citotóxico (LTC) para controle da infecção. Em paralelo, ocorre a produção de citocinas relacionadas à susceptibilidade (Th2: IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e TGF- β), que controlam a resposta inflamatória. O desequilíbrio da relação Th1/Th2/Th17 pode resultar na progressão da infecção.

2.5 Os polimorfismos genéticos

Os polimorfismos genéticos são variações nas sequências de nucleotídeos que ocorrem na população de forma estável. Estes são classificados de acordo com o tipo de repetição nucleotídica em uma sequência gênica (NUSSBAUM; McINNES; WILLARD, 2008). Os

microssatélites são caracterizados por repetições de sequências de 2 a 5 nucleotídeos (*Small tandem repeats*-STR), no entanto, os minissatélites apresentam número variável de repetições, com sequências de nucleotídeos maiores (*Variable number of tandem repeats*-VNTR). A variação de apenas um único nucleotídeo é denominado SNP (*Single Nucleotide Polymorfisms*), sendo este tipo amplamente distribuído pelos genomas. Uma grande proporção de SNPs localiza-se em regiões que precedem fases de leitura aberta do gene ou em regiões intergênicas reguladoras da expressão do gene, sendo responsáveis pelo estabelecimento de fenótipos que expressam diferentes quantidades de proteínas codificadas, denominados “polimorfismos funcionais”, ao lado de variantes que levam a modificação da própria proteína (FRADE *et al.*, 2010; NUSSBAUM; McINNES; WILLARD, 2008).

O avanço da bioinformática possibilitou também o surgimento de técnicas mais sensíveis, com alta capacidade analítica e quantitativa, como é o caso da PCR em tempo real ou qPCR capazes de identificar os polimorfismos genéticos (PONCHEL *et al.*, 2003). A qPCR pode ser utilizada na identificação de doenças genéticas a partir do escaneamento de mutações simultâneas e genotipagem (DUFRESNE *et al.*, 2006; PAIVA-CAVALCANTI; REGIS-DASILVA; GOMES, 2010; TALMI-FRANK *et al.*, 2010; WOLFF *et al.*, 2008).

2.6 Genes envolvidos na imunopatogênese das formas clínicas da leishmaniose visceral (*SLC11A1*, *LECT2*, *CCL1*, *CCL16* e *IL4*)

Estudos de equilíbrio de ligação foram desenvolvidos visando elucidar as vias de sinalização importantes na imunopatogênese da LV, sendo localizadas regiões do cromossomo 9 relacionadas à susceptibilidade a forma clínica sintomática da LV, juntamente com regiões nos cromossomos 15 e 19 relacionadas ao fenótipo das formas assintomáticas (DTH+) (JERONIMO *et al.*, 2007b). No cromossomo 9, pôde-se destacar regiões intergênicas entre os genes codificantes da proteína transmembrana 215 (*TMEM215*) e Aprataxin (*APTX*) contendo SNPs, somados aos encontrados no gene *latent transforming growth factor beta binding protein 4* (*LTBP4*) do cromossomo 19, em que ambas apresentaram associação a LV (WEIRATHER *et al.*, 2017).

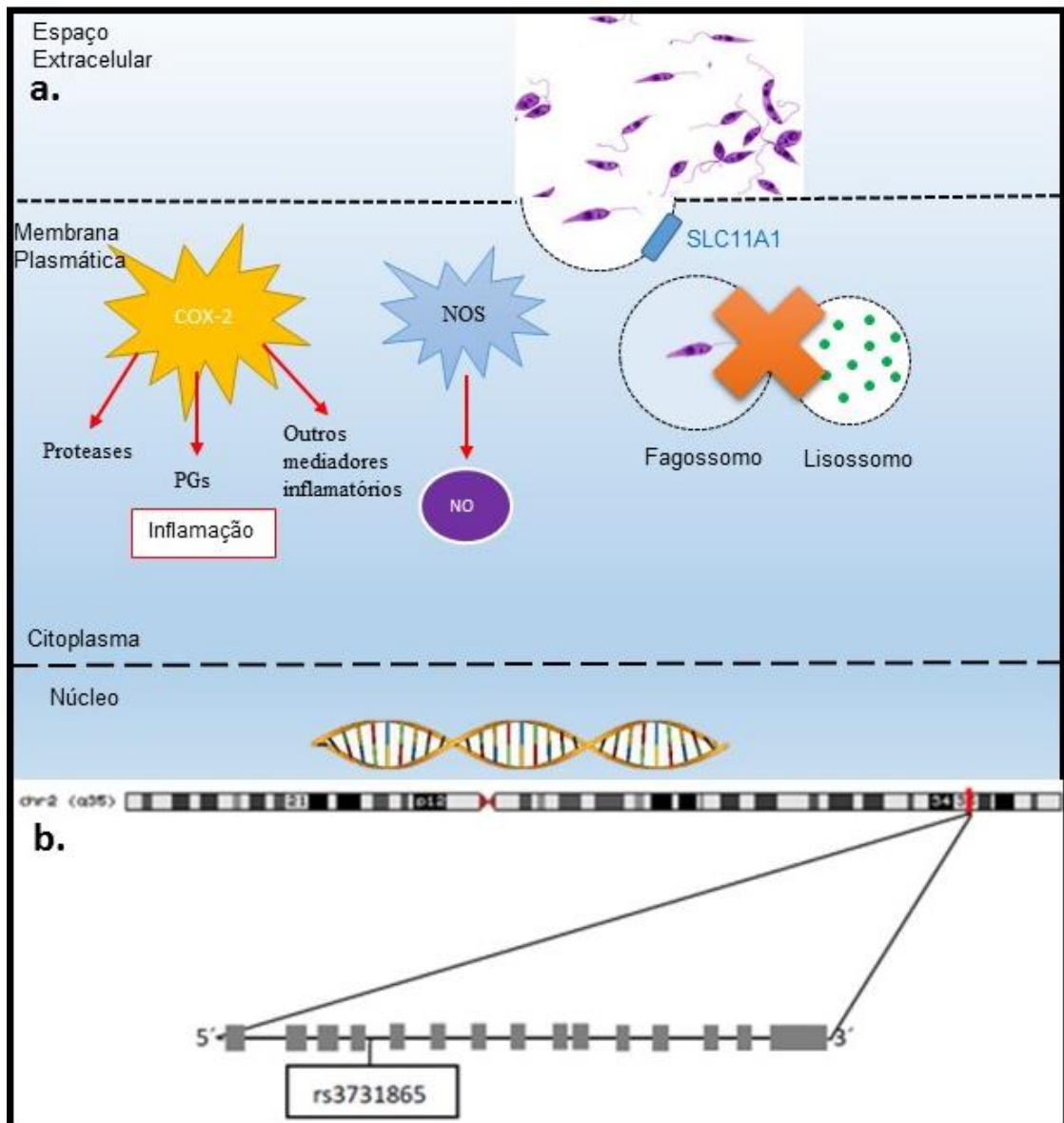
O gene *TMEM215* codifica uma proteína de membrana de 215 aminoácidos, cujos estudos disponíveis relatam sua importância na interação com domínios proteicos de ancoragem de proteínas do citoesqueleto (LUCK *et al.*, 2011). No entanto, o *APTX* codifica Aprataxin, membro da superfamília da histidina, cujas mutações deletérias foram descritas influenciando processos relacionados ao dano oxidativo (HARRIS *et al.*, 2009). O maior número de

informações na literatura é referente ao gene *LTBP4* (rs8107014), que está relacionado à via do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), participando da ativação das células Th17, sendo associado ao fenótipo DTH+ (JERONIMO *et al.*, 2007a). Devido à escassez de informações da literatura, os estudos de associação gênica envolvendo os genes *SLC11A1*, *LECT2*, *CCL1*, *CCL16* e *IL4* tornam-se essenciais para melhor elucidar a imunopatogênese da LV na coinfeção com HIV.

Inicialmente, o papel dos fatores genéticos do hospedeiro foi destacado a partir de estudos em modelos murinos, sugerindo que os polimorfismos do gene *solute carrier family 11 member 1* (*SLC11A1*) favorecem a resistência inata mediada por macrófagos em infecções com parasitas do complexo *L. donovani* (BLACKWELL *et al.*, 2009). Em humanos, os polimorfismos no gene *SLC11A1* foram associados à susceptibilidade à LV (BRALIOU *et al.*, 2019; BUCHETON *et al.*, 2003; EJGHAL *et al.*, 2014; MOHAMED *et al.*, 2004), HIV, salmonelose, leprose e tuberculose (BLACKWELL *et al.*, 2009). Este gene está localizado no cromossomo 2q35, contendo 15 exons, sendo expresso em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas derivadas da medula óssea (CELLIER *et al.*, 1994; VIDAL *et al.*, 1993).

A regulação da via de ativação do macrófago é mediada por este gene, apresentando influência direta na formação do fagossomo, sendo também importante em outras vias de regulação endossomal e lisossomal (LANG *et al.*, 1997; VIDAL *et al.*, 1993). A regulação da expressão do gene *SLC11A1* é mediada pelo promotor GTn, cujas funções da proteína estão relacionadas ao polimorfismo no cromossomo 2q35, íntron 4 (469+14G/C) (rs3731865) (ATES *et al.*, 2009; BLACKWELL *et al.*, 2009) (Figura7).

Figura 7 – SLC11A1 regula a via de ativação de macrófagos.



Fonte: O autor.

Legenda: a. Interior do macrófago; b. Localização do SNP no cromossomo 2.

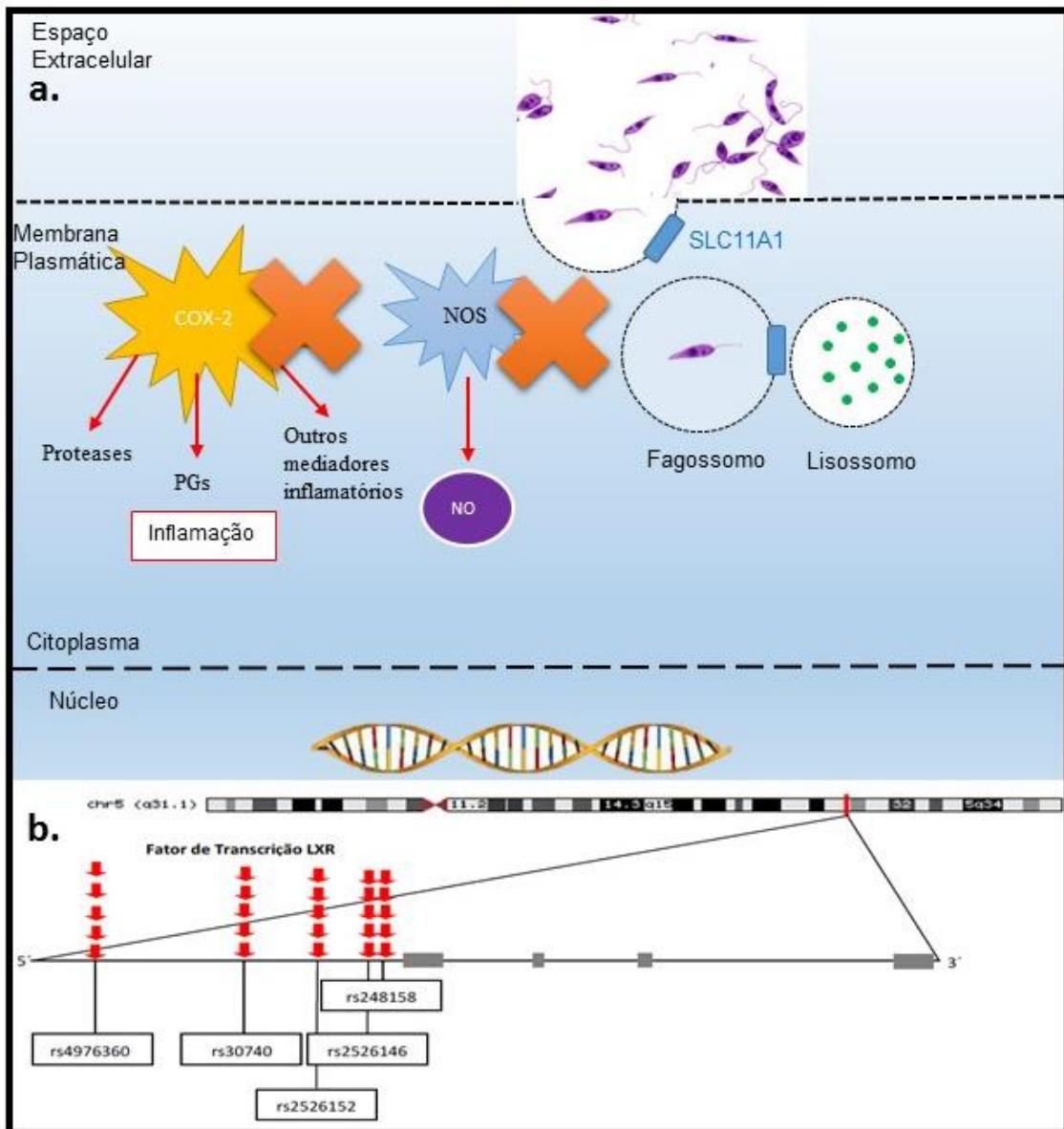
Nota: *Leishmania* é fagocitada pelo macrófago. A proteína SLC11A1 do fagossomo impossibilita a formação do fagolisossomo para eliminação de *Leishmania*, devido a presença de polimorfismo (rs3731865) em seu gene localizado no cromossomo 2 humano.

O gene *LECT2* codifica a proteína *leukocyte cell-derived chemotaxin 2*, sendo expressa principalmente no fígado. A proteína apresenta função quimiotática para neutrófilos (YAMAGOE; MIZUNO; SUZUKI, 1998a). Yamagoe et al. (1998b) afirmam que os sítios de iniciação dos transcritos ocorrem entre 70-230 nucleotídeos *upstream* do códon de início da tradução. Várias sequencias envolvidas no controle da transcrição, que são relevantes para expressão no fígado, foram encontradas na região 5' não traduzida do gene *LECT2*, assim, sugerindo que os fenótipos relacionados à LV são relacionados aos SNPs encontrados *upstream*

do gene *LECT2*, localizado no cromossomo 5q31.1 (rs248158, rs2526146, rs2526152, rs30740 e rs4976360) (JERONIMO *et al.*, 2007a).

Análises *in silico* sugerem que SNPs na região *upstream* do *LECT2* são associados a susceptibilidade a LV, favorecendo ou interferindo na ligação do fator de transcrição do receptor hepático X (*LXR*), regulador dos mediadores inflamatórios de macrófagos, da indução do óxido nítrico sintase (NOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (JERONIMO *et al.*, 2007a; JOSEPH *et al.*, 2003) (Figura 8).

Figura 8 – LECT2 regula mediadores inflamatórios, a indução de NOS e COX-2.



Fonte: O autor.

Legenda: a. Interior do macrófago; b. Localização dos SNPs no cromossomo 5.

Nota: O fator de transcrição do receptor hepático X (*LXR*) se liga/ou é impedido de ligar na região promotora do gene *LECT2*, devido à presença de polimorfismos (rs248158, rs2526146, rs2526152, rs30740 e rs4976360) cromossomo 5 humano, resultando na regulação negativa dos mediadores inflamatórios de macrófagos, da indução do óxido nítrico sintase (NOS) e cicloxigenase-2 (COX-2), sendo incapaz controlar a infecção por *Leishmania*. PGs: prostaglandinas.

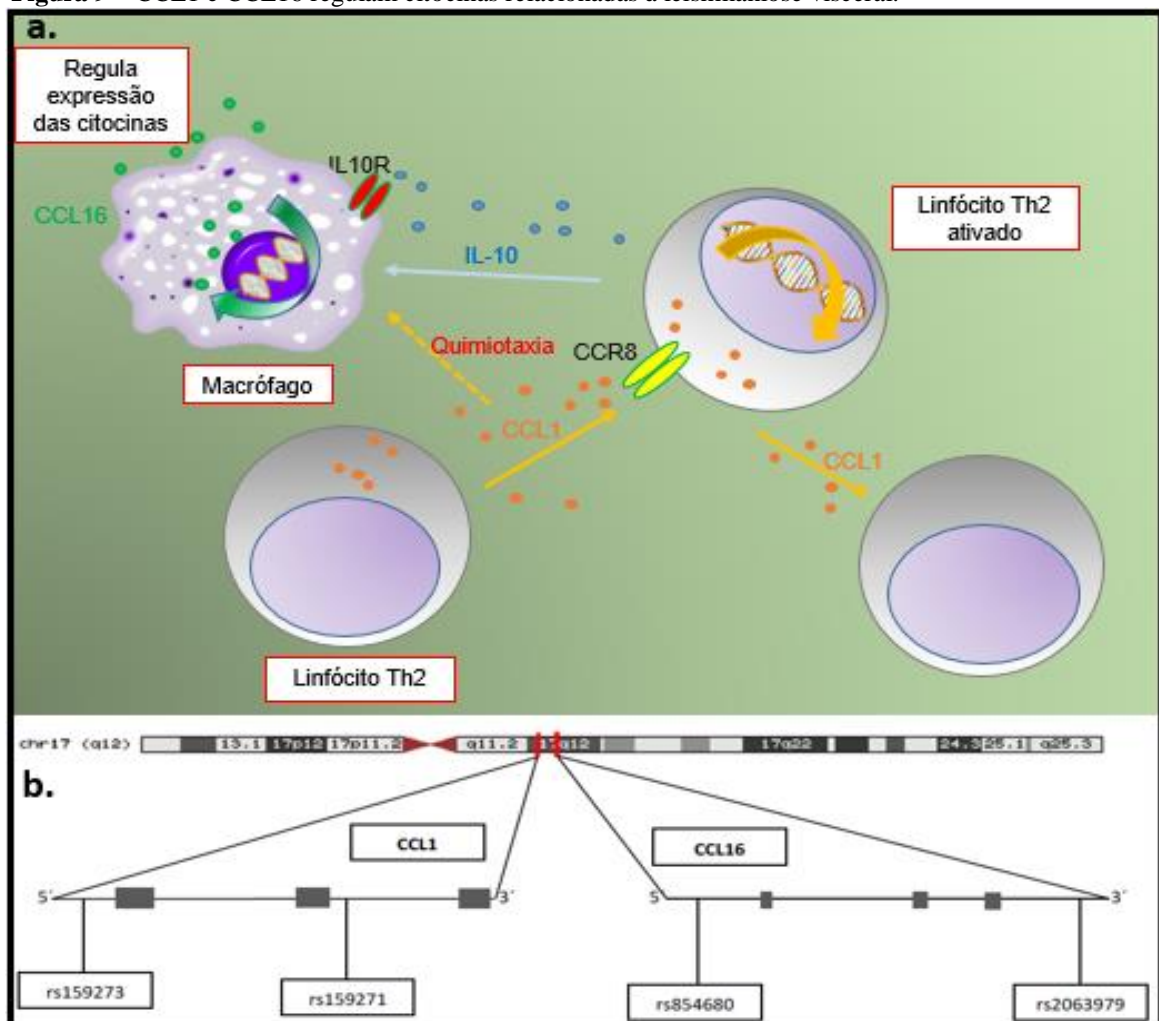
Os genes codificantes das quimiocinas *CCL1* e *CCL16* estão localizados no cromossomo 17q11.2-q23.3, sendo relacionados à susceptibilidade em LV (JAMIESON *et al.*, 2007; MENEZES-SOUZA *et al.*, 2012). Indivíduos sintomáticos apresentam impedimento à expressão de quimiocinas CCL e seus receptores CCR no fígado e baço, órgãos acometidos pela imunopatogenicidade da doença (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Em particular, *CCL1* interage com o receptor de quimiocina CC, sendo expresso e secretado preferencialmente pelas células Th2 e Treg (SACKS *et al.*, 1987), apresentando

atividade quimiotática para monócitos. *L. donovani* desencadeia ativação de macrófagos mediados por IL-10, associados às células T, regulando os níveis de CCL16 em macrófagos (MUSSO *et al.*, 2005).

O produto do gene *CCL16* suprime a proliferação de células progenitoras mielóides. Jamieson *et al.* (2007) sugerem que os SNPs dos genes *CCL1* (rs159271 e rs159273) e *CCL16* (rs2063979 e rs854680) também regulam múltiplas citocinas relacionadas à LV. A susceptibilidade às manifestações clínicas da LV são relacionadas à ativação de respostas Th2, baseadas na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 (MISHRA *et al.*, 2014) (Figura 9).

Figura 9 – CCL1 e CCL16 regulam citocinas relacionadas à leishmaniose visceral.



Fonte: o autor.

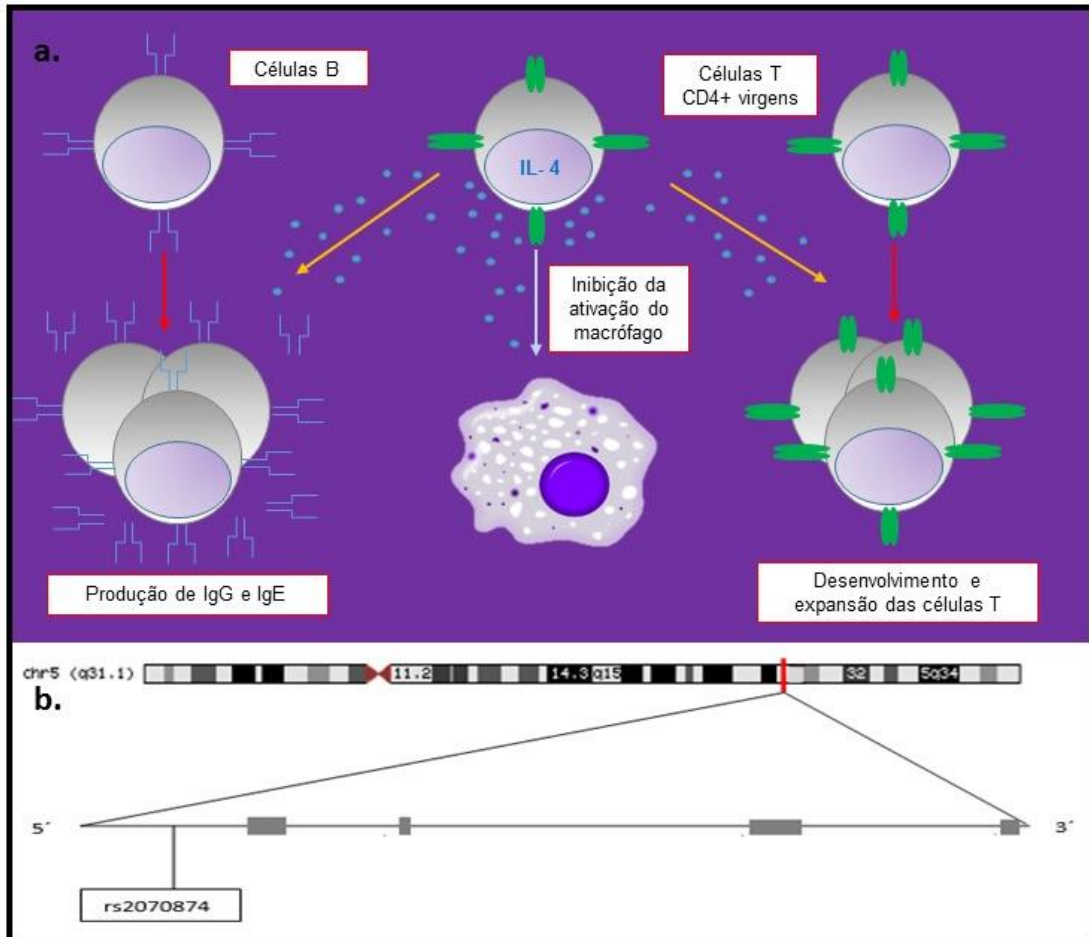
Legenda: a. Ativação de citocinas; b. Localização dos SNPs no cromossomo 17.

Nota: A quimiocina CCL1 estimula a produção de IL-10 pelos linfócitos, sendo quimiotática para monócitos. A IL-10 regula a produção de CCL16, que é responsável pela ativação de macrófagos. Os polimorfismos nos genes *CCL1* (rs159271 e rs159273) e *CCL16* (rs2063979 e rs854680) localizados no cromossomo 17 humano influenciam a elaboração de uma resposta Th2 robusta, sendo incapaz de controlar a resposta inflamatória desencadeada por *Leishmania*. IL10R: receptor de IL-10; CCR8: receptor de quimiocina 8, o qual CCL1 se liga.

O gene da interleucina humana 4 (*IL4*) está posicionado no cromossomo 5q31-33 dos linfócitos Th2 CD4+, basófilos e mastócitos. O gene codifica uma citocina anti-inflamatória, reguladora da resposta humoral e adaptativa, favorecendo a diferenciação de células T CD4+ *naive* (GYAN *et al.*, 2004). A IL-4 está relacionada à susceptibilidade a várias infecções parasitárias, como malária, esquistossomose e leishmanioses (FALLON *et al.*, 2000; JERONIMO *et al.*, 2007a; JHA *et al.*, 2012). Os polimorfismos funcionais localizados na região promotora de *IL4* (rs2070874), -34C/T na 5'UTR modulam a susceptibilidade à LV (JERONIMO *et al.*, 2007a; MISHRA *et al.*, 2014), sendo relacionados à elevação dos níveis de IgG e IgE (Figura 10) no soro durante as infecções, auto regulação do gene e regulação da expressão de receptores para o HIV (GOLETTI *et al.*, 2002; ROCKMAN *et al.*, 2003).

Polimorfismos nos genes *SLC11A1* e *IL4* foram relacionados à susceptibilidade à infecção pelo HIV e também a susceptibilidade à LV. Nos indivíduos imunodeprimidos e nos imunocomprometidos, como nos casos de infecção por HIV, a LV é considerada uma infecção oportunista (ALVAR *et al.*, 1997) e representa um fator de risco para recidiva (HORST *et al.*, 2008).

Figura 10 – IL-4 regula resposta humoral e adaptativa.



Fonte: O autor.

Legenda: a. Papel da IL-4 na resposta imune; b. Localização do SNP no cromossomo 5.

Nota: A IL-4 sintetizada pelo linfócito T influencia a ativação dos linfócitos B, resultando no aumento da produção das imunoglobulinas IgG e IgE, inibe a ativação de macrófagos e a diferenciação de células T CD4+ virgens, que reduz o desenvolvimento e expande as células T. Esses eventos são influenciados pela presença do polimorfismo do gene *IL4* (rs2070874) localizado no cromossomo 5 humano.

2.7 MicroRNAs como fatores epigenéticos relacionados à leishmaniose visceral

A epigenética é a ciência que estuda as modificações nas funções gênicas que não são resultantes de alterações na sequência de DNA (BIRD, 2014; EAGER *et al.*, 2007). Essas alterações podem se perpetuar por várias divisões celulares, permanecendo por várias gerações (WEI *et al.*, 2017). Ademais, pode-se destacar que os mecanismos epigenéticos mais significativos correspondem à metilação do DNA, modificações de histonas e os processos mediados pelos RNAs (PESCHANSKY; WAHLESTEDT, 2014). Dessa forma, uma classe de RNAs não codificantes (microRNAs) pode exercer um importante papel na regulação gênica (WEY *et al.*, 2017).

Os microRNAs (miRNAs) são moléculas pequenas de aproximadamente 22 nucleotídeos que atuam na regulação gênica, degradando ou inibindo a tradução do mRNA, desempenhando, dessa forma, um papel importante no controle epigenético (ADAMS; KASINSKI; SLACK, 2014; AMBROS, 2004). Os miRNAs podem ser secretados pelas células, permanecendo no meio extracelular ou sendo captados por outros grupos celulares (SUNDARBOSE; KARTHA; SUBRAMANIAN, 2013). A presença de miRNAs na circulação sanguínea tem sido descrita para várias doenças, cujos perfis de expressão variam com o grau e a progressão da patologia, mantendo-se estáveis na circulação dentro de exossomas, ligados à proteína argonauta 2 (AGO2) ou em complexos lipoproteicos (LARREA *et al.*, 2016).

Os miRNAs apresentam relação com diferentes doenças, envolvendo diferentes mecanismos celulares relacionados ao controle e proliferação do câncer, hipóxia, angiogênese, pré-eclâmpsia, epilepsia, espermatogênese e apoptose (BAVELLONI *et al.*, 2017). Ademais, os miRNAs afetam as vias celulares, regulando as respostas imune inata e adaptativa, conferindo adaptabilidade às células em resposta aos patógenos (LEUNG; SHARP, 2010; O'CONNELL *et al.*, 2010). Consequentemente, a alteração dos níveis de expressão de miRNAs pode influenciar a transcrição gênica, que interferem na remodelação da cromatina, alterando o fenótipo celular (BAVELLONI *et al.*, 2017). Dessa forma, os níveis de expressão desses RNAs não codificantes podem afetar a proliferação celular, podendo ser associados a patologias, sendo considerados importantes biomarcadores para doenças (HA, 2011).

2.7.1 miR-182

O microRNA-182 (miR-182) é expresso em uma variedade de células e tecidos, como osteoblastos, linfócitos, retina, ouvido interno e tecido adiposo (DONG *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2007). Estudos mostraram que o miR-182 desempenha um papel importante na normal diferenciação, desenvolvimento e manutenção desses tecidos e órgãos, e sua expressão anormal está envolvida em muitas doenças, incluindo retinopatia, doenças autoimunes, tumores, obesidade e diabetes (DONG *et al.*, 2016).

O miR-182 tem sido associado ao diagnóstico de viroses, como a hepatite C (SHAHEEN *et al.*, 2018) e o HIV (CHEN *et al.*, 2013); de bacterioses, como em casos de sepse (OJHA *et al.*, 2019); e helmintoses, como a esquistossomose (HUANG *et al.*, 2018; KELADA *et al.*, 2013). O miR-182 é considerado uma molécula reguladora da resposta Th1/Th2 para doenças parasitárias, sendo expresso em células dendríticas ativadas, linfócitos Th2 e linfócitos T reguladores (KELADA *et al.*, 2013; STUMPFOVA *et al.*, 2014). Assim, Dong *et al.* (2016)

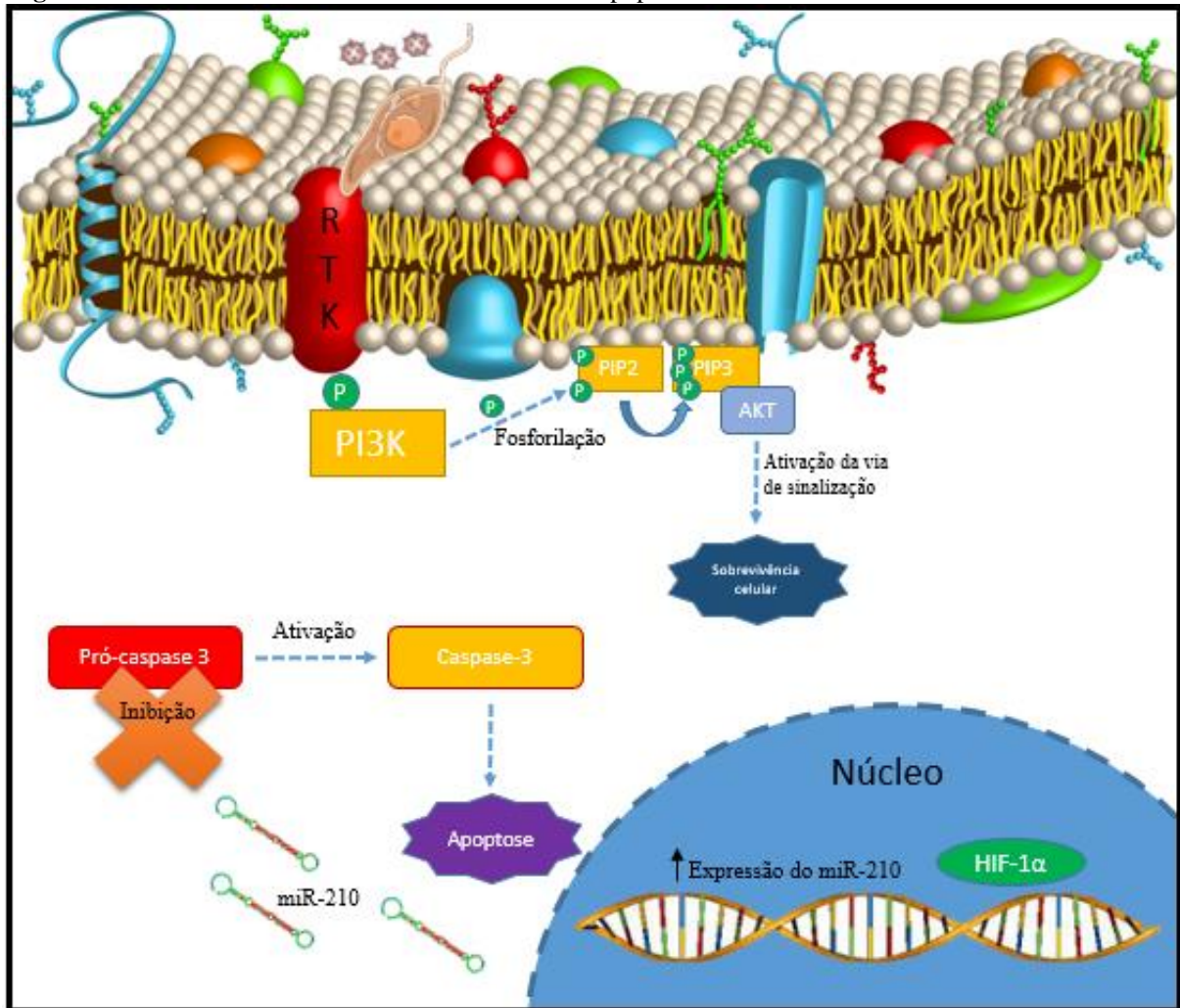
sugerem que o miR-182 está envolvido na regulação da expansão de células T e secreção de citocinas, pelo fato de Kelada et al. (2013) sugerirem que sua expressão em células T reguladoras é induzida pela IL-4, que reduz a secreção de IL-2 na infecção por *Schistosoma mansoni*. No entanto, o envolvimento desse miRNA em vias de sinalização da resposta imunológica da leishmaniose visceral e da coinfeção LV/HIV ainda não foi explorado na literatura.

2.7.2 miR-210

Leishmania spp. são parasitas intracelulares capazes de conferir resistência à apoptose durante as fases iniciais de infecção em macrófagos infectados, assim, favorecendo a sua diferenciação e sobrevivência no interior das células (RUHLAND; LEAL; KIMA, 2007). A resistência é estabelecida a partir da ativação da via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt) e da inibição da ativação da caspase-3, uma enzima que desempenha um papel central na fase de execução da apoptose celular (GALLUZZI *et al.*, 2016).

Os miRNAs aparecem entre as moléculas envolvidas na regulação da apoptose, cujos níveis de expressão são modulados durante a infecção por *Leishmania* spp. (BAVELLONI *et al.*, 2017). A expressão do miR-210 aumenta consideravelmente durante o curso da infecção, sendo regulada pelo fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1 α), que é um fator de transcrição (BAVELLONI *et al.*, 2017; LEMAIRE *et al.*, 2013). Estudos sugerem que o miR-210 seja responsável pela inibição da pró-caspase-3, forma inativa da caspase-3, bloqueando a apoptose em macrófagos humanos infectados por *L. major* e *L. infantum* (Figura 11) (LEMAIRE *et al.*, 2013; LISI *et al.*, 2005). Consequentemente, espera-se que *L. infantum* interfira no perfil de expressão de miRNAs relacionados à susceptibilidade à coinfeção LV/HIV.

Figura 11 – Influência do miR-210 nos mecanismos de apoptose.



Fonte: O autor.

Nota: No momento da internalização de *Leishmania*, ocorre a ativação da via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt) via receptor tirosina quinase (RTK), favorecendo a sobrevivência do patógeno no interior do macrófago. Em paralelo, o fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) aumenta a expressão do miR-210, que inibe a ativação da pró-caspase-3, resultando no bloqueio da apoptose em macrófagos infectados.

2.7.3 miR-122

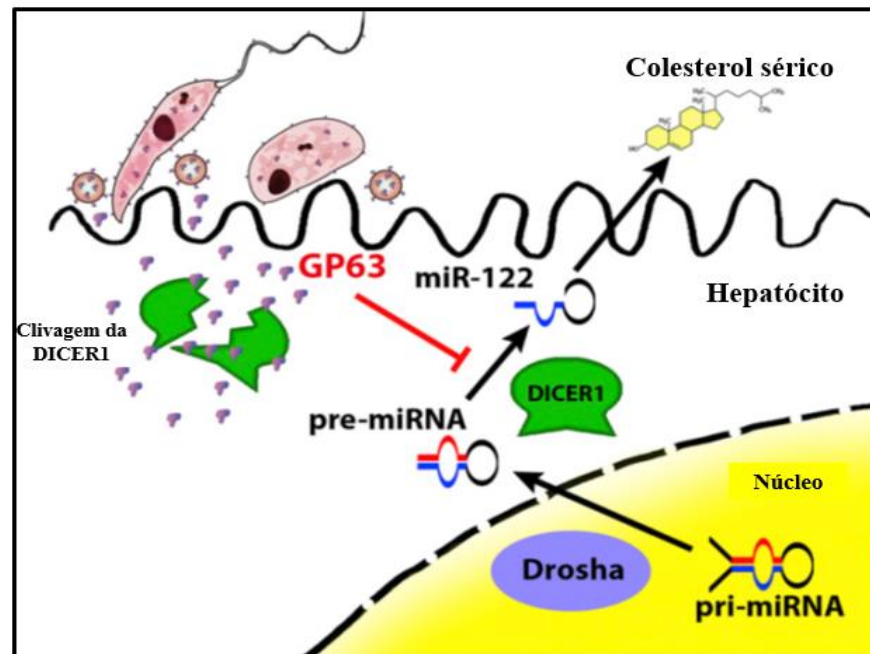
Na leishmaniose visceral podem ser evidenciadas alterações clínicas relacionadas ao metabolismo dos lipídeos, principalmente os baixos níveis de colesterol LDL em pacientes infectados (LAL *et al.*, 2007). No fígado há um grande repertório de moléculas envolvidas no metabolismo do colesterol, no processo de inflamação hepática e carcinogênese, sendo o miRNA-122 a molécula envolvida em 70% desses mecanismos (WEN; FRIEDMAN, 2012).

Nos hepatócitos, o precursor do miRNA-122 (pri-miRNA-122), localizado no núcleo celular, é clivado em pré-miR-122 por um complexo proteico denominado Microprocessador, que é formado pelas enzimas Drosha e DGCR8. Posteriormente, o pré-miR-122 é transferido

para o citoplasma pela exportina 5, sendo processado pela enzima DICER1, assumindo a forma de miRNA-122 maduro (Figura 12) (DESCOTEAUX; MORADIN; DUQUE, 2013; WEN; FRIEDMAN, 2012). Em seu último estágio de maturação, o miR-122 interage com a AGO2 formando o Complexo de Indução do Silenciamento do RNA (RISC), que é um modulador do metabolismo do colesterol (DESCOTEAUX; MORADIN; DUQUE, 2013).

Durante a infecção de macrófagos hepáticos por *Leishmania* spp., os hepatócitos internalizam exossomas contendo a metaloproteína GP63 do parasita, em que a molécula bloqueia o metabolismo de lipídeos através da clivagem da enzima DICER1 (Figura 12). Conseqüentemente, não ocorre a maturação do miRNA-122, modulando negativamente a síntese da HMGCoA redutase, a enzima responsável pela biogênese do colesterol. A sequência de eventos justifica a redução dos níveis de colesterol sérico (DESCOTEAUX; MORADIN; DUQUE, 2013). Ademais, os baixos níveis de colesterol na membrana plasmática prejudicam a apresentação de antígenos ocasionada pelo aumento da fluidez das membranas celulares, conferindo susceptibilidade à leishmaniose visceral (GHOSH *et al.*, 2013).

Figura 12 - GP63 bloqueia o metabolismo do colesterol através da clivagem da enzima DICER1.



Fonte: Descoteaux, Moradin e Duque (2013, tradução nossa).

Nota: O hepatócito internaliza exossomas contendo a metaloproteína GP63 de *Leishmania*, que cliva a enzima DICER1 e resulta na não maturação do miR-122, modulando negativamente o metabolismo do colesterol.

3 JUSTIFICATIVA

A coinfeção LV/HIV-aids é uma doença grave que atinge principalmente a população dos países em desenvolvimento (LINDOSO *et al.*, 2016), onde os estudos dos fatores genéticos do hospedeiro tornam-se essenciais para a compreensão das respostas imunes inata e adaptativa no curso da infecção.

As análises dos fatores imunogenéticos do hospedeiro podem proporcionar uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que controlam a eliminação da infecção, o que poderá explicar as diferenças de susceptibilidade/resistência entre as populações (SOPHIE *et al.*, 2017). As informações referentes aos fatores imunogenéticos envolvidos na coinfeção LV/HIV-aids são escassas na literatura, em particular na América Latina, sendo necessários estudos que explorem tanto os polimorfismos genéticos, citocinas e a expressão de miRNAs, visando a compreensão do efeito genético e epigenético no desenvolvimento das manifestações clínicas na coinfeção.

Dessa forma, a presente proposta poderá utilizar os resultados referentes aos polimorfismos e à expressão gênica como biomarcadores na condução clínica dos casos diagnosticados de coinfeção, como também na perspectiva de otimizar a conduta terapêutica para melhor subsidiar o prognóstico dos mesmos.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Os polimorfismos genéticos dos genes *SLC11A1*, *LECT2*, *CCL1*, *CCL16* e *IL4*, as citocinas do perfil Th1/Th2 e a expressão dos miRNAs hsa-miR182-5p, hsa-mir210-3p e hsa-mir122-3p estão associados à coinfeção leishmaniose visceral/HIV?

5 HIPÓTESE

- a) Os polimorfismos genéticos dos genes *SLC11A1*, *LECT2*, *CCL1*, *CCL16* e *IL4* estão relacionados à susceptibilidade à coinfeção leishmaniose visceral/HIV;
- b) As citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 são associadas à coinfeção leishmaniose visceral/HIV;
- c) A expressão dos miRNAs hsa-miR182-5p, hsa-mir210-3p e hsa-mir122-3p são biomarcadores da coinfeção leishmaniose visceral/HIV.

6 OBJETIVO GERAL

Investigar os polimorfismos genéticos dos genes *SLC11A1*, *LECT2*, *CCL1*, *CCL16* e *IL4*, associado à dosagem de citocinas do perfil Th1/Th2 e a expressão dos miRNAs hsa-miR182-5p, hsa-mir210-3p e hsa-mir122-3p em pacientes coinfectados com leishmaniose visceral/HIV.

6.1 Objetivos específicos

- a) Caracterizar do ponto de vista epidemiológico e clinico-laboratorial os grupos LV/HIV e HIV;
- b) Investigar a associação dos polimorfismos dos genes *SLC11A1*, *LECT2*, *CCL1*, *CCL16*, e *IL4* nos grupos LV/HIV e HIV;
- c) Avaliar os níveis de citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 e identificar o padrão de expressão gênica dos microRNAs hsa-mir182-5p, hsa-mir210-3p e hsa-mir122-3p nos grupos LV/HIV e HIV.

7 MÉTODO

Os aspectos metodológicos para a execução da pesquisa são abordados nas seções seguintes.

7.1 Área de estudo

Neste estudo foram utilizadas as amostras de soro e de DNA provenientes de pacientes acompanhados nos três principais serviços de referência para HIV localizados em Recife – Pernambuco: o Hospital Universitário Oswaldo Cruz, vinculado a Universidade de Pernambuco (HUOC-UPE), Hospital Correia Picanço da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco (HCP/SUS/SES-PE) e o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE); e do Serviço de Atenção Especializada e Centro de Aconselhamento e Testagem (SAE/CTA) do município de Petrolina, Mesorregião do Rio São Francisco.

7.2 Caracterização dos grupos

O estudo utilizou amostras de soro e DNA de indivíduos que foram investigados para LV. Para critério do presente estudo, foram utilizados dois grupos de comparação: Grupo 1- Pacientes LV/HIV; Grupo 2-Pacientes HIV.

7.3 Definição dos casos

Grupo LV/HIV- Os coinfectados foram subdivididos em 2 subgrupos:

- a) Subgrupo 1: Indivíduos procedentes de área endêmica para LV, com presença ou ausência de manifestações clínicas para a LV, e pelo menos um dos três exames positivos: diagnóstico parasitológico, KAtex e/ou ITS1-PCR;
- b) Subgrupo 2: Indivíduos procedentes de área endêmica para LV, com presença ou ausência de manifestações clínicas para a LV, e pelo menos um teste sorológico positivo: teste imunocromatográfico rK39, ELISA-rK39 e/ou DAT.

Grupo HIV – Indivíduos que foram diagnosticados nos respectivos serviços de saúde por dois testes rápidos para HIV ou um teste sorológico ELISA ou imunoblot, sendo obtida a carga viral por RT-qPCR (BRASIL, 2018). Ademais, todos os pacientes apresentaram todos os testes diagnósticos negativos para LV.

Na determinação da frequência genotípica e alélica dos SNPs foram utilizados dois grupos de comparação: pacientes coinfectados dos subgrupos 1 e 2, sendo os indivíduos monoinfectados HIV considerados controles. Para a dosagem de citocinas e avaliação da expressão gênica dos miRNAs foram utilizados pacientes exclusivamente do subgrupo 1 e monoinfectados HIV como controles (Quadro 1).

Quadro 1 - Definição de casos de LV/HIV.

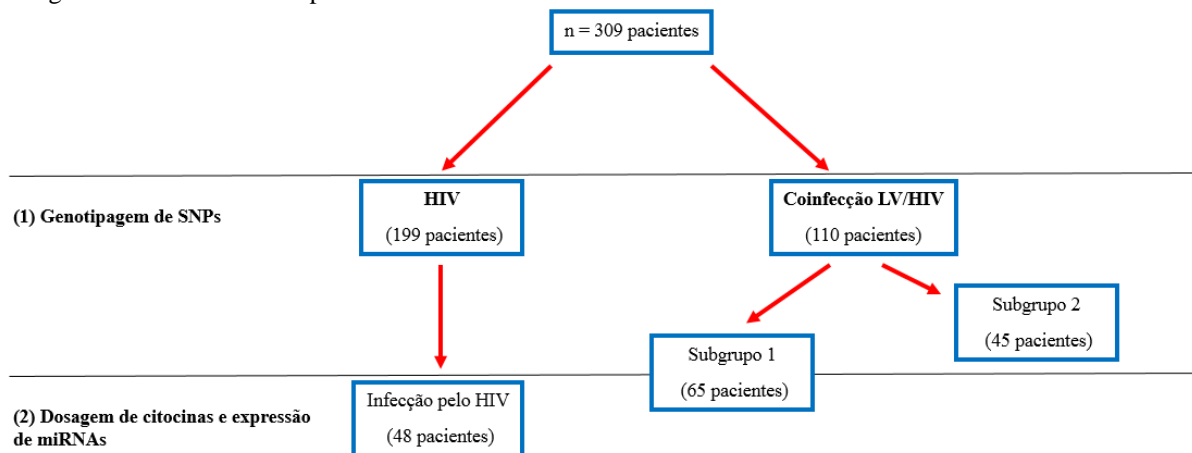
Infecção Exames Ensaio	Subgrupo 1 Genotipagem de SNPs; dosagem de citocinas e expressão de miRNAs	Subgrupo 2 Genotipagem de SNPs
Diagnóstico parasitológico	X	
KAtex	X	
ITS1-PCR	X	
rK39		X
ELISA-rK39		X
DAT		X

Fonte: O autor.

7.4 Tamanho amostral

A amostra foi de conveniência, sendo proveniente do biorrepositório de soro e DNA do Instituto Aggeu Magalhães. Este estudo utilizou 309 amostras de DNA extraídas de sangue total de pacientes com HIV, das quais 110 amostras de DNA foram provenientes de pacientes dos subgrupos 1 e 2, com no mínimo um teste diagnóstico positivo para LV, sendo 199 amostras de pacientes HIV. Também foram selecionadas 113 amostras de soro, das quais 65 foram provenientes de pacientes do subgrupo 1 com no mínimo um teste diagnóstico (diagnóstico parasitológico, KAtex e/ou ITS1-PCR) para LV, sendo 48 amostras provenientes de pacientes com HIV (Figura 13).

Figura 13 – Fluxo de atividades com direcionamento de amostras para os ensaios de genotipagem de SNPs, dosagem de citocinas e de expressão de miRNAs.



Fonte: O autor.

7.5 Desenho do estudo

O estudo foi transversal com grupos de comparação, investigando polimorfismos genéticos, dosagem de citocinas e expressão de miRNAs em pacientes coinfectados com leishmaniose visceral/HIV e monoinfectados HIV.

7.6 Coleta de dados clínico-laboratoriais

Os dados pessoais, como nome, sexo, idade, procedência, fatores de risco e exames clínico-laboratoriais de cada paciente foram coletados diretamente das fichas clínico-epidemiológicas, arquivadas no laboratório de doenças transmissíveis do IAM-Fiocruz.

7.7 Ensaios

Os procedimentos laboratoriais aplicados neste estudo seguem categorizados nos subtópicos subsequentes.

7.7.1 Detecção dos polimorfismos

Foi utilizada a metodologia do PCR em tempo real, através do sistema TaqMan[®], para detecção dos SNPs em genes da imunidade, a partir das amostras de DNA dos pacientes LV/HIV e HIV. O kit TaqMan[®] SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA) é constituído por sondas marcadas com fluorocromos desenhadas especificamente para complementar os alelos em estudo. Os SNPs dos genes estão representados pelas respectivas sondas no quadro 2.

Para a genotipagem, foi utilizado o PCR em tempo real QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA), aplicando as seguintes condições: *Pre-read stage* de 30 segundos a 60°C, *hold stage* de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos (15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C) e um *post-read stage* de 30 segundos a 60°C.

Quadro 2 – Polimorfismos genéticos de *SLC11A1*, *LECT2*, *CCL1*, *CCL16* e *IL4*.

Gene	Número de identificação do SNP
<i>SLC11A1</i>	rs3731865
<i>LECT2</i>	rs248158, rs2526146, rs2526152, rs30740 e rs4976360
<i>CCL1</i>	rs159271 e rs159273
<i>CCL16</i>	rs2063979 e rs854680
<i>IL4</i>	rs2070874

Fonte: Thermo Fisher Scientific (2018, tradução nossa).

7.7.2 Dosagem de citocinas

A dosagem sérica das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 (kit Human Th1/Th2 Cytokine CBA, San Jose, CA, USA) foi realizada a partir do sistema Cytometric Bead Array (CBA) da Becton Dickinson-BD segundo recomendação do fabricante (Quadro 3). Em cada tubo foi adicionado 25 μ L da mistura de esferas de captura (anti-IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2) conjugadas com anticorpos monoclonais. Em seguida, alíquotas de 25 μ L do soro, 25 μ L dos padrões de citocinas previamente diluídos e 25 μ L de diluente apenas (controle negativo) foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL. Vinte cinco microlitros de um coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2) foram adicionados com subsequente incubação por 3 h horas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 μ L da solução de lavagem (“Wash buffer”, reagente presente no kit CBA) e os tubos foram centrifugados a 300 x g, por 5 minutos e, o sobrenadante foi descartado. As esferas foram então ressuspensas

em 300 μ L “Wash buffer” e adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD, San Jose, CA, USA).

Quadro 3 – Limite de detecção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2.

Citocina	Limite de detecção (pg/mL)
IFN-γ	3,7
TNF	3,8
IL-10	4,5
IL-6	2,4
IL-4	4,9
IL-2	2,6

Fonte: Becton, Dickinson and Company BD Biosciences (2014, tradução nossa).

7.7.3 Extração de RNA

O RNA foi extraído a partir do soro, utilizando o mirRNAeasy Serum/PlasmaKit (50) (QIAGEN, Hilden, Germany) segundo orientações do fabricante. O RNA total extraído foi utilizado para a obtenção do cDNA imediatamente após a extração; dessa forma, evitando a degradação da amostra. Posteriormente, os RNAs foram armazenados em refrigerador -80 °C.

7.7.4 Ensaios de expressão de miRNAs

Após a extração do RNA total, os miRNAs presentes foram quantificados no equipamento Qubit™, utilizando o kit Qubit™ microRNA Assay (Thermo Fisher Scientific). O passo seguinte consistiu na preparação do mix para obtenção do cDNA com *primers* específicos, seguindo as recomendações do kit TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Posteriormente, foram realizados ensaios de expressão de miRNAs, seguindo as recomendações do kit TaqMan® Advanced MicroRNA Assays [sondas: has-miR-182-5p (477935_mir), hsa-miR-210-3p (477970_mir), hsa-miR-122-3p (477874_mir), hsa-miR-24-3p (477992_mir) e cel-miR-39-3p (478293_mir)] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O controle exógeno cel mir-39 miRVana miRNA mimic (ID: MC10956) (Ambion® Life Technologies, USA) e o controle endógeno hsa-mir-24 foram utilizados para normalização dos dados.

Para realização dos ensaios de expressão, foi utilizado o PCR em tempo real QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA), aplicando as seguintes condições: *Hold stage* de 20 segundos a 95°C, seguido de 40 ciclos no *PCR stage* (1 segundo a 95°C e 20 segundos a 60°C). O cálculo da quantificação relativa foi realizado utilizando o método *comparative cycle threshold (Ct)*. O *Fold change* de cada miRNA foi calculado a partir do $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

7.8 Plano de tabulação e análises estatísticas dos dados

Os dados paramétricos e não paramétricos relacionados à caracterização clínica e laboratorial dos indivíduos coinfectados LV/HIV e HIV foram comparados utilizando o software GraphPad Prism v.5.0, aplicando os testes Qui-quadrado de Pearson (χ^2), teste t de Student ou teste Mann-Whitney, quando necessário. O software PLINK v1.9 foi utilizado para verificar se as distribuições genotípica e alélica estão de acordo com a hipótese do equilíbrio de Hardy-Weinberg, aplicando o Qui-quadrado de Pearson (χ^2) ou teste t de Student, quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. A magnitude destas associações foi estimada como *Odds ratio (OR)*, utilizando intervalos de confiança de 95%. A regressão logística foi utilizada para o ajuste do OR de acordo com os possíveis fatores de confusão a partir do software IBM SPSS Statistics v.22.

Em relação às análises de desequilíbrio de ligação, foi utilizado o LDproxy, uma plataforma do National Institutes of Health (2018), cujos dados foram extraídos do projeto “1000 Genomes” e os reference SNP ID number (rs) foram indexados baseados no dbSNP build 142. Os dados gerados a partir da dosagem de citocinas no BD CBA foram analisados pelo software FCAP Array v3.0. Os dados relacionados à expressão dos miRNAs foram analisados no software DExpressionSuite v1.1. A correlação entre as variáveis numéricas foram avaliadas a partir do método Spearman-rho.

7.9 Considerações éticas

O projeto (CAAE: 61218816.1.0000.5190) foi aprovado no parecer 1.870.364 do CEP do IAM-Fiocruz. Todos os dados obtidos foram mantidos em sigilo e utilizados exclusivamente para os fins da pesquisa científica (Anexo A).

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção apresenta os três artigos que fazem parte da tese. No primeiro artigo “*Characterization of Leishmania (L.) infantum chagasi in visceral leishmaniasis associated with HIV co-infection in Northeastern Brazil*”, foi escrito um relato de caso de uma paciente coinfectada LV/HIV submetida às ferramentas de tipagem molecular em sangue periférico, visando a caracterização da espécie *Leishmania (L.) infantum chagasi*. No segundo artigo “*SLC11A1 (rs3731865) polymorphism and susceptibility to visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients from Northeastern Brazil*”, foi realizada a associação de polimorfismos genéticos localizados nos genes *SLC11A1*, *LECT2*, *CCL1*, *CCL16* e *IL4* à susceptibilidade a infecção LV/HIV. No terceiro artigo “*Higher serum levels of TNF and IL-4 cytokines and low miR-182 expression in VL-HIV co-infected patients*”, foram avaliadas as citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2, além dos perfis de expressão de miR-182, miR-210 miR-122, como potenciais biomarcadores da infecção LV/HIV.

8.1 Artigo 1: Characterization of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in visceral leishmaniasis associated with hiv co-infection in Northeastern Brazil

Este artigo é referente ao objetivo específico “a” da tese: “*Caracterizar do ponto de vista epidemiológico e clinico-laboratorial os grupos LV/HIV e HIV*”. O artigo foi publicado na revista do *Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*.

Resumo

A leishmaniose visceral, associada à coinfeção HIV/Aids, está se tornando uma doença mais agressiva, o que complica um prognóstico acurado. Uma paciente de 21 anos de idade, portadora de HIV, que apresentava características clínicas da leishmaniose visceral, foi incluída neste estudo. O exame parasitológico direto, a cultura em meio Novy-MacNeal-Nicolle e a kDNA PCR do sangue periférico foram todos positivos. Métodos de tipagem, eletroforese de enzimas multilocus e ITS1-RFLP PCR em sangue periférico confirmaram infecção por *Leishmania (L.) infantum chagasi*. A PCR provou ser a ferramenta mais segura e acessível, quando comparada aos outros métodos de caracterização. A ITS1-RFLP PCR pode diagnosticar e caracterizar *Leishmania spp.* em áreas endêmicas e não endêmicas, favorecendo o prognóstico e permitindo o tratamento adequado dos pacientes.

Palavras-chave: Caracterização. *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Leishmaniose visceral. HIV/Aids. Coinfeção

Characterization of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in visceral leishmaniasis associated with hiv co-infection in Northeastern Brazil

Elaine Cristina Bomfim de Lima¹, Walter Lins Barbosa Júnior¹, Maria Edileuza Felinto de Brito¹, Fábio Lopes de Melo¹, Sinval Pinto Brandão Filho¹, Zulma Maria de Medeiros^{1,2}

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis, associated with HIV/AIDS coinfection, is becoming a more aggressive disease, complicating an accurate prognosis. A 21-year-old HIV-positive female presenting with clinical features of visceral leishmaniasis was enrolled in this study. Bone marrow cytology, Novy-MacNeal-Nicolle culture and kDNA PCR of peripheral blood were all positive. Typing methods, multilocus enzyme electrophoresis and ITS1-RFLP PCR of peripheral blood confirmed infection by *Leishmania (L.) infantum chagasi*. PCR has proved to be safer and more affordable than other characterization methods; ITS1-RFLP PCR can diagnose and type *Leishmania* spp. in both endemic and non-endemic areas, favoring the prognosis and allowing the appropriate treatment of patients.

KEYWORDS: Characterization. *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Visceral leishmaniasis. HIV/AIDS. Coinfection.

Visceral leishmaniasis (VL) caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* is a severe disease that takes the lives of thousands of people every year. Since the 1980s, the human immunodeficiency virus (HIV)/acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) has increased the number of VL-HIV/AIDS coinfection cases reported in Europe, Africa, Asia and Latin America^{1,2}.

Clinical diagnosis of VL-HIV/AIDS coinfection is difficult, as *Leishmania* species may initially cause non-specific clinical features in some patients, even when associated with epidemiological data³.

Cytological examination of spleen, bone marrow and/or lymph node stained-smears are considered the gold standards for VL-HIV/AIDS diagnosis. Nonetheless, cytology may increase the risk of adverse events in patients, as invasive procedures are required to obtain these samples⁴. The culture in NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) medium to isolate parasites is the classical procedure recommended for the identification of *Leishmania* spp., and is essential for characterization based on multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)^{5,6}, the gold standard method for *Leishmania* spp. identification⁷. Nonetheless, this may require samples obtained by invasive procedures (e.g., spleen, bone marrow or lymph node). Moreover, culture may be time-consuming and difficult to perform at primary health care facilities³.

Disease control requires efficient monitoring, rapid identification of *Leishmania* strains and management of molecular tools⁸. Polymerase chain reaction (PCR) is a powerful tool for detecting *Leishmania* DNA in bone marrow aspirates, blood samples and lymph nodes and has shown to be more sensitive than parasitological

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brazil

²Universidade de Pernambuco, Instituto de Ciências Biológicas, Recife, Pernambuco, Brazil

Correspondence to: Zulma Maria de Medeiros
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, CEP 50740-465, Recife, PE, Brazil.

E-mail: medeiros@cpqam.fiocruz.br

Received: 22 November 2016

Accepted: 22 February 2017

methods. Nowadays, there are too many targets for visceral leishmaniasis detection and the choice of primers is important because each target has its own sensitivity and specificity^{9,10}. Le Fichoux *et al.*¹¹ have used RV1 and RV2 primers to amplify kinetoplast minicircle sequences (kDNA), which are the most commonly used target for VL diagnosis. Schönian *et al.*¹² have used LITSR and L5.8S primers to identify *Leishmania* species and the lineage of strains by ITS1-RFLP PCR.

The present study describes the clinical, epidemiological and molecular characterization of *Leishmania (L.) infantum chagasi* isolated from a visceral leishmaniasis/HIV coinfecting patient, outlining the usefulness of the methods adopted here and showing which is the most affordable.

A 21-year-old HIV-positive female lived in the Agreste region of Northeastern Brazil, an area endemic of visceral leishmaniasis. She had presented with clinical features of visceral leishmaniasis and been referred to *Hospital Universitário Oswaldo Cruz*, Recife, in the State of Pernambuco. Anemia associated with anisocytosis and microcytosis, leukopenia with lymphopenia and neutropenia were the most frequent laboratory alterations found. She had presented with episodes of fever, splenomegaly, pale mucous membranes and weight loss of over 5 kg in four months. All these data were available in the patient's clinical records. Bone marrow and peripheral blood samples were collected.

The aim of the study was to carry out a pioneering evaluation that applied a set of characterization methods for the detection of *Leishmania* spp. in an HIV-positive patient. Bone marrow cytology was carried out to search for amastigote forms by optical microscopy. In parallel, 200 µL of bone marrow were inoculated under sterile conditions in NNN culture tubes; 500 µL of NNN/Schneider two-phase medium were added to increase and accelerate the positivity of cultures. Promastigote forms were visualized by optical microscopy using 10 µL of culture¹³. The isolate was submitted to multilocus enzyme electrophoresis (MLEE).

MLEE was performed with the following enzyme extracts: glucose-phosphate isomerase (GPI, E.C.5.3.1.9), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, E.C.1.1.1.49), isocitrate dehydrogenase with NAD and NADP (IDHNAD IDHNADP, E.C.1.1.1.42) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH, E.C.1.1.1.43)⁷. This isolate was compared to reference strains of different *Leishmania* species at the Oswaldo Cruz Institute – FIOCRUZ (CLIOC/IOC-FIOCRUZ), e.g. *Leishmania (L.) infantum chagasi*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi* and *L. naiff* to determine the species.

Peripheral blood DNA extraction was carried out using the commercial extraction kit-illustra™ tissue

& cells genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), for the PCR methods. NanoDrop 2000 (Thermo Scientific Nano Drop Products) was used to determine the DNA concentration.

In kDNA PCR, the reaction mixture (25 µL of total volume) was prepared containing a buffer of 1 X Invitrogen, 0.25 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 units of Taq polymerase (Platinum®, Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 µL of DNA (14 ng/µL), 25 pmol of each primer, RV1 (5'-CTTTTCTGGTCCC GCCGGGTAGG) and RV2 (5'-CACCTGGCTATTTTACACCA)¹¹, amplifying a conserved region of the minicircle kDNA of *Leishmania*. After an initial denaturation (5 min at 94 °C), 35 cycles (denaturation, 30 sec at 94 °C; annealing, 1 min at 67 °C; extension 30 sec at 72 °C) were performed and PCR was concluded by a final extension at 70 °C for 10 min. This PCR assay achieved a maximum analytical sensitivity of 100 fg. DNA amplification was performed in a LifePro thermal cycler (Hangzhou Bioer Technology, Binjiang, China). All reactions included a positive and a negative control. The expected final product was 145 bp. The amplification products were visualized by horizontal electrophoresis in 2% ethidium bromide-stained agarose gels.

The ITS1 PCR reaction mixture (50 µL of total volume) was prepared containing 25 µL 2 x GoTaq® Green Master Mix (Promega Corp., Madison, WI), 50 pmol of primers: LITSR (5'-CTGGATCATTTC CGATG) and L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGACTT)¹², amplifying a portion of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) non-coding region found in the SSU rRNA delimited by the 5.8S and 18S genes. After an initial denaturation (3 min at 95 °C), 35 cycles (denaturation, 40 sec at 95 °C; annealing, 45 sec at 53 °C; extension 1 min at 72 °C) were carried out and PCR was concluded by a final extension at 70 °C for 6 min. This PCR assay achieved a maximum analytical sensitivity of 100 fg. Reactions were performed with 2 µL (14 ng/µL), 5 µL and 10 µL of DNA and included a positive and a negative control. The expected amplification product was 300-350 bp and they were visualized by horizontal electrophoresis in 2% ethidium bromide-stained agarose gels.

Restriction enzyme analyses (RFLP) were performed in a total volume of 15 µL containing the ITS1 PCR product digested by the restriction enzyme *Hae*III without prior purification, under the conditions recommended by the supplier (Hybaid GmbH Heidelberg, GE). ITS1-RFLP PCR was also tested on *Leishmania* strains from both, an endemic and a non-endemic area in Northeastern Brazil. The product underwent electrophoresis on 4.0% ethidium bromide-stained agarose gels. The band patterns from the prototypes were compared to the RFLP patterns of the clinical sample.

The increasing number of visceral leishmaniasis/HIV coinfection cases in Brazil is worrying, in view of the inherent risk of developing VL when HIV is present¹⁴⁻¹⁶. Additionally, the cumulative immunosuppression accelerates the clinical progression of both infections¹⁷. In the present study, the female patient presented classical clinical and epidemiological features of VL infection.

In endemic regions, where multiple species of *Leishmania* may coexist, geographical distribution may be an inadequate criterion. Clinical symptoms can be problematic for identification of the infecting species, since some cause both cutaneous and mucocutaneous disease (*L. braziliensis* complex, *L. aethiopica*), while others cause both visceral and cutaneous disease (e.g. *L. donovani* complex)¹².

Bone marrow cytology has variable sensitivities in both immunocompetent and immunosuppressed patients^{4,18}. However, higher sensitivities of bone marrow cytology found in HIV-patients have been attributed to more intense *Leishmania* parasitemias in this group. Furthermore, the low number of *Leishmania*-infected cells in patients with pancytopenia, as well as those who have received previous treatments, may lead to false-negative results³. Bone marrow cytology should be requested when low sensitivity serological tests were performed alone, in order to avoid false-negative results. The patient in the present study had a positive bone marrow cytology.

It is recommended to perform culture isolation of *Leishmania* in parallel with bone marrow-stained smears in HIV-positive patients with symptoms (e.g. fever, visceromegaly, or hematological abnormalities), as VL/HIV coinfection diagnosis is difficult³. The patient had a *Leishmania* spp. positive culture.

The allelic variation of this strain was tested using a panel of five enzymes by MLEE, confirming the presence of *Leishmania (L.) infantum chagasi* IOC-L 3328 (MHOM/BR/2011/COS). One PCR target was the kinetoplast minicircle, which led to detection of *Leishmania* DNA in this clinical sample (data not shown). Amplification of this region is frequently chosen as the target for human kala-azar molecular diagnosis because of its higher sensitivity due to multi-copy number sequences^{9,10}. PCR has consistently shown to be better than direct examination and culture, particularly in samples with low parasitic load¹⁹. Kinetoplast DNA PCR has been successfully used to identify *Leishmania* in blood samples of symptomatic and asymptomatic, immunocompetent and immunocompromised patients. Nevertheless, the kinetoplast is a heterogeneous target for which a great diversity of primers has been described and this may result in loss of assay accuracy, complicating the construction of RFLP patterns. However, it does distinguish

a few selected species, such as *L. infantum*, *L. donovani* and *L. major*^{9,10,18}.

The last PCR assay, targeting the ITS1 region, detected *Leishmania* DNA in a blood sample. PCR targeting the non-coding region found in the SSU rRNA has provided good results and proved to be substantially more sensitive than microscopic examination, especially in cases of HIV-coinfection¹⁰. The main advantage of ITS1 PCR over kDNA PCR is that the former can distinguish many clinically important *Leishmania* species through RFLP patterns^{9,12}. ITS1-RFLP PCR in *Leishmania* trains from endemic and non-endemic areas in Northeastern Brazil was able to establish specific patterns (Figure 1). In this clinical sample, 2 µL (14 ng/µL) and 5 µL of DNA were insufficient to establish RFLP patterns after ITS1 PCR, but 10 µL did work (Figures 2A, 2B), thus confirming *Leishmania (L.) infantum chagasi* species.

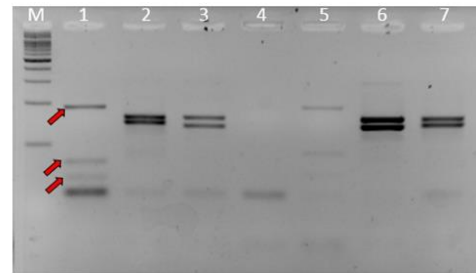


Figure 1 - ITS1-RFLP PCR of different *Leishmania* species with the restriction endonuclease Hae III. M - 100 bp marker (Promega®); 1 - *Leishmania (L.) infantum chagasi*; 2 - *L. braziliensis*; 3 - *L. amazonensis*; 4 - *L. guyanensis*; 5 - *L. mexicana*; 6 - *L. lainsoni*; 7 - *L. shawi*. Specific fragments of *Leishmania (L.) infantum chagasi* are indicated by the arrow

Characterization of *Leishmania* spp. makes it possible to conduct epidemiological studies and assess the *Leishmania* population, besides targeting more accurate disease control measures. PCR-based methods that use blood samples have proved to be safer and more affordable than the other characterization methods mentioned above; especially ITS1-RFLP PCR, which can determine the levels of *Leishmania* spp. in both endemic and non-endemic areas favoring the prognosis and allowing the appropriate treatment of patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by CAPES, CNPq and FACEPE grants. We would like to thank the staff of *Hospital Universitário Oswaldo Cruz* and the *Leishmania* collection of the Oswaldo Cruz Institute for their collaboration.

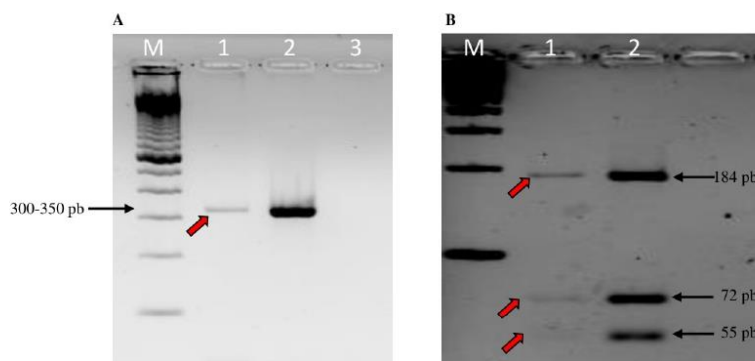
Lima *et al.*

Figure 2 - ITS1 PCR product (A) and RFLP PCR with Hae III (B) for typing of *Leishmania* spp. The positive control and the clinical sample had amplification products of 300-350 bp (MHOM/BR/1974/PP75). The clinical sample (MHOM/BR/2011/COS), indicated by the arrow, showed a banding pattern matching the one of *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi*. M –100 bp marker (Promega®); 1- Clinical strain; 2- Positive control; 3-Negative control

REFERENCES

- Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res.* 2006;123:357-88.
- Alemayehu M, Wubshet M, Mesfin N. Magnitude of visceral leishmaniasis and poor treatment outcome among HIV patients: meta-analysis and systematic review. *HIV AIDS (Auckl).* 2016;8:75-81.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Boer MD, Cañavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:334-59.
- Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992;86:505-7.
- López-Vélez R, Perez-Molina JA, Guerrero A, Baquero F, Villarrubia J, Escribano L, et al. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58:436-43.
- Deniau M, Cañavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003;97 Suppl 1:115-33.
- Cupolillo E, Grimaldi JRG, Momen H. A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50:296-311.
- Haralambous C, Antoniou M, Pratlong F, Dedet JP, Soteriadou K. Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani*/*Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60:33-42.
- Silva MA, Medeiros RA, Brandão-Filho S, Melo FL, Medeiros Z. Molecular targets used in PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Rev Eletr Farm.* 2010;7:1-15.
- Sakkas H, Gartzonica C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis.* 2016;53:8-16.
- le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuve JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1953-7.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;47:349-58.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
- Cavalcanti AT, Medeiros Z, Lopes F, Andrade LD, Ferreira VM, Magalhães V, et al. Diagnosing visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection: a case series study in Pernambuco, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2012;54:43-7.
- Silva ED, Andrade LD, Araújo PS, Silveira VM, Padilha CE, Silva MA, et al. Case study of patient with HIV/AIDS and visceral leishmaniasis co-infection in multiple episodes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2013;55:425-8.
- Barbosa Júnior WL, Araújo PS, Andrade LD, Santos AM, Silva MA, Dantas-Torres FS, et al. Rapid tests and the diagnosis of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome coinfection. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;93:967-9.
- Vassallo M, Moranne O, Ambrosetti D, Jeandel PY, Pomares C, Cassuto E, et al. Visceral leishmaniasis due to *Leishmania*

- infantum with renal involvement in HIV-infected patients. BMC Infect Dis. 2014;14:561.
18. Cota GF, de Sousa MR, de Freitas Nogueira BM, Gomes LI, Oliveira E, Assis TS, et al. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. Am J Trop Med Hyg. 2013;89:570-7.
19. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. J Clin Microbiol. 2007;45:21-5.

8.2 Artigo 2: *SLC11A1* (rs3731865) polymorphism and susceptibility to visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients from Northeastern Brazil

Este artigo é referente aos objetivos específicos “a” e “b” da tese: “Caracterizar do ponto de vista epidemiológico e clinico-laboratorial os grupos LV/HIV e HIV; investigar a associação dos polimorfismos dos genes *SLC11A1*, *LECT2*, *CCL1*, *CCL16* e *IL4* nos grupos LV/HIV e HIV”. O artigo foi submetido a revista *Parasitology Research*.

Resumo

Com o surgimento do vírus da imunodeficiência humana (HIV)/síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), o número de casos de coinfeção por leishmaniose visceral/HIV (LV/HIV) aumentou em todo o mundo, principalmente no Brasil. O desenvolvimento de formas clínicas da LV pode ser influenciado pelo estado nutricional, idade e fatores genéticos do hospedeiro, sendo variáveis importantes que determinam a susceptibilidade à doença. Não existem na literatura estudos com uma abordagem envolvendo genes candidatos, avaliados diretamente em uma população coinfectada LV/HIV. Neste trabalho, determinamos e analisamos a associação dos polimorfismos genéticos nos genes *SLC11A1*, *LECT2*, *CCL1*, *CCL16* e *IL4* com a suscetibilidade à coinfeção por LV/HIV no Nordeste do Brasil. Foram analisadas 309 amostras de DNA extraídas de sangue periférico de pacientes com HIV, cujos dados clínicos e hematológicos foram coletados de prontuários médicos. O diagnóstico de LV foi confirmado em 110 de 309 amostras; posteriormente, a genotipagem foi realizada a partir da tecnologia TaqMan. Nossos resultados confirmaram a associação entre o polimorfismo do gene *SLC11A1* (rs3731865) com coinfeção LV/HIV ($p = 0,0206$, OR 1,8126, IC 95% 1,1050-2,9727). Além disso, o genótipo GG em *SLC11A1* ($p = 0,0050$, OR 3,0395, IC 95% 1,4065-6,5789) e a contagem de linfócitos T CD4 + ($p = 0,0030$, OR 0,9980, IC 95% 0,9970-0,9990) foram associados à coinfeção LV/HIV no modelo multivariado. O polimorfismo de *SLC11A1* (rs3731865) foi associado à coinfeção LV/HIV, sugerindo a existência de um mecanismo genético envolvido na susceptibilidade para LV em pacientes HIV. Esses resultados poderão direcionar pesquisas de novos alvos terapêuticos e marcadores genéticos para a população de coinfectados LV/HIV.

Palavras-chave: HIV. Leishmaniose visceral. Polimorfismos. Susceptibilidade

***SLC11A1* (rs3731865) polymorphism and susceptibility to visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients from Northeastern Brazil**

Walter Lins Barbosa Júnior¹ (<https://orcid.org/0000-0002-8301-6600>), Alda Maria Justo², Ana Maria Aguiar dos Santos¹, Rodrigo Feliciano do Carmo³, Fábio Lopes de Melo¹, Luydson Richardson Silva Vasconcelos^{1,2}, Zulma Maria de Medeiros^{1,2}

¹Department of Parasitology, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, 50670-465, Brazil

²Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50030-230, Brazil

³Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, 56304-917, Brazil
Address correspondence to Walter Lins Barbosa Júnior, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Recife, Pernambuco, 50740-465, Brazil. E-mail: walterb716@gmail.com. Telephone: +55 81 97903458

Acknowledgments We would like to thank the staff of Universidade do Vale do São Francisco for their support. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001 and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco [FACEPE (APQ 1712-4.01/15)] and Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) [(PAPES VII - Processo (401857/2015-8)].

Author's contribution Walter Lins Barbosa Júnior was fully involved in this research, including data collection, molecular techniques (genotyping), statistical analysis and writing this manuscript. Alda Maria Justo and Ana Maria Aguiar dos Santos conducted sample, clinical and hematological data collection from medical records. Rodrigo Feliciano do Carmo and Fábio Lopes de Melo were responsible for methodology supervising. Luydson Richardson Silva Vasconcelos was responsible for methodology supervising and participated in statistical analyses. Zulma Maria de Medeiros supervised the study methodology and the overall conduct of this research. All authors reviewed and approved the final version of this manuscript.

Abstract

Following the emergence of the human immunodeficiency virus (HIV)/acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), the number of visceral leishmaniasis-HIV (VL-HIV) co-infections has increased worldwide, mainly in Brazil. The development of clinical forms of VL can be influenced by nutritional status, age and host genetic factors, which are important variables determining susceptibility to disease. There are no studies with a candidate gene approach assayed directly in VL-HIV co-infected population. Herein, we determined and analyzed the association of *SLC11A1*, *LECT2*, *CCL1*, *CCL16* and *IL4* genetic polymorphisms to susceptibility to VL-HIV co-infection in Northeastern Brazil. We analyzed 309 DNA samples extracted from peripheral blood of HIV patients, which clinical and hematological data were collected from medical records. The diagnosis of VL was confirmed in 110 out of 309; genotyping was carried out by TaqMan assays afterwards. Our results confirmed the association between *SLC11A1* polymorphism (rs3731865) with VL-HIV co-infection ($p = 0.0206$, OR 1.8126, 95% CI 1.1050-2.9727). In addition, the *SLC11A1* genotype GG ($p = 0.0050$, OR 3.0395, 95% CI 1.4065-6.5789) and CD4+ T-lymphocytes count ($p = 0.0030$, OR 0.9980, 95% CI 0.9970-0.9990) were associated with VL-HIV co-infected patients in a multivariate model. The polymorphism of *SLC11A1* gene (rs3731865) was associated with VL-HIV co-infection, suggesting a possible genetic mechanism involved in susceptibility of VL in HIV patients. This finding can open new therapeutic targets and genetic markers for VL-HIV co-infected population.

Keywords HIV; visceral leishmaniasis; polymorphisms; susceptibility

Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) caused by *Leishmania infantum* is a life-threatening disease that takes lives of thousands of people annually. Following the emergence of the human immunodeficiency virus (HIV) during the 1980s, the number of VL-HIV co-infections has increased in the world (Alemayehu et al., 2016; Cruz et al. 2006).

In Europe, about 5% of total global cases of VL-HIV co-infection are reported in the Mediterranean, characterized by an anthroponotic transmission cycle of *Leishmania* (Lindoso et al. 2016; Monge-Maillo et al. 2014). However, in some areas of Ethiopia, 35% of patients with visceral leishmaniasis had HIV, which has been spreading to neighboring countries, such as Sudan (Diro et al. 2014). The prevalence of co-infection in India increased from 0.88% to 2.18% between 2000 and 2006 (Singh 2014). Latin America countries, such as Mexico, Argentina, Paraguay, Venezuela and Brazil are reporting new VL-HIV co-infection cases. In

Brazil, the incidence of VL-HIV cases has increased from 0.7% to 8.5% between 2000 and 2012 (Lindoso et al. 2014).

The development of symptomatic and asymptomatic clinical forms can be influenced by nutritional status, age and host genetic factors, which are important variables determining susceptibility to VL (Jeronimo et al. 2007). Based on that, genes have been identified from candidate gene studies and GWASs (genome-wide association studies) as possible genetic factors related to disease outcome (Blackwell et al. 2009; Jamieson et al. 2007; Jeronimo et al. 2007).

Several host genes were studied in order to understand immune response mechanisms involved in infectious disease clearance. The solute carrier family 11 member a1 (*SLC11A1*) (OMIM*600266) gene product regulates macrophage activation pathway and there is an important genetic polymorphism located on intron 4 (469+14G/C) (rs3731865), which plays a pivotal role in leishmaniasis susceptibility related to host-parasite interaction (Blackwell et al. 2009; Braliou et al. 2019; Mohamed et al. 2004; Mukherjee et al. 2016; Singh et al. 2017). Moreover, some genes encode neutrophil chemotactic factors, such *LECT2* encodes leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (OMIM*602882), whose polymorphisms related were found in GWASs (rs248158, rs2526146, rs2526152, rs30740 and rs4976360) (Jeronimo et al. 2007). In addition, *CCL1* (OMIM*182281) and *CCL16* (OMIM*601394) gene products were related to monocyte-chemotactic activity and suppression of myeloid progenitor cell proliferation (Jamieson et al. 2007). Genetic polymorphisms are localized on the *CCL1* (rs159271 and rs159273) and *CCL16* (rs2063979 and rs854680), respectively (Jamieson et al. 2007). Furthermore, *IL4* gene encodes an anti-inflammatory cytokine (OMIM*147780), exhibiting functional polymorphisms in the promoter region (rs2070874) (Jeronimo et al. 2007; Mishra et al. 2014).

Genetic association studies can provide a better understanding of molecular mechanisms that control the outcome of infections, which may explain the differences in susceptibility among populations (Sophie et al. 2017). To the best of our knowledge, this study is the pioneer to evaluate association between immunity genes polymorphisms to VL-HIV co-infection in Brazil. Therefore, the present study was designed to determine and analyze the association of *SLC11A1*, *LECT2*, *CCL1*, *CCL16* and *IL4* polymorphisms and susceptibility to VL-HIV co-infection in admixture population from Northeastern Brazil.

Materials and methods

Samples

Initially, were enrolled 309 HIV patients from Northeastern Brazil. Peripheral blood samples were collected with informed consent over the course of six years (2012-2017). Samples for this study were genomic DNA extracted from peripheral blood (ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System, Madison, WI, USA), stored at -20 °C until use in the biorepository of the Doenças Transmissíveis Laboratory, Instituto Aggeu Magalhães (IAM-Fiocruz).

Diagnostic criteria for VL and HIV

The definition of VL-HIV co-infection was based on at least one positive test for visceral leishmaniasis (Ministério da Saúde, 2011). Cases included 110 VL patients, confirmed by one or more diagnostic methods employed: bone marrow cytology, conventional polymerase chain reaction (PCR) (Lima et al. 2017) with primers targeting the non-coding region found in the SSU rRNA of *L. infantum*, direct agglutination test [DAT (Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands)], rK39 immunochromatographic test [rK39 ICT (DiaMed-IT LEISH®; DiaMed AG, Cressier-sur-Morat, Switzerland)], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Abass et al. 2013) and latex agglutination test [KAtex (Kalon Biological, Guildford, UK)]. Controls comprised a total of 199 HIV positive patients, all negative to VL diagnostic methods, confirmed by two HIV rapid tests (TR1 and TR2), with viral load and CD4+ T-lymphocytes count collected (Ministério da Saúde, 2018).

Clinical and hematological features

Clinical and hematological features were collected from questionnaire and analysis of medical records: Hemoglobin, leucocyte count, irregular fever, hepatomegaly, splenomegaly, weight loss, cough, diarrhea, asthenia, pale mucous membranes, highly active antiretroviral therapy (HAART) use, HIV viral load and CD4+ T-lymphocytes count. It is important to highlight that some clinical and hematological data were missing in the medical records. Therefore, we recovered 193 out of 309 clinical and hematological features showed in table 1.

Genotyping

Polymorphism genotyping were performed by real time quantitative PCR (qPCR) using the TaqMan® SNP Genotyping Assay Kit [*LECT2* (ID C__3275152_10, C__16033407_20, C__2540549_10, C__2265141_10, C__27917799_20); *SLC11A1* (ID C__1659793_10); *IL4* (ID C__16176215_10); *CCL1* (ID C__1022813_20, C__1022815_10);

CCL16 (ID C__11397114_10, C__7449259_10)], according to the manufacturer's instructions. Polymorphism genotyping were assayed at QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA), under the following conditions: Pre-read stage of 30 sec at 60°C, hold stage of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles at PCR stage (15 sec at 95°C followed by 60 sec at 60°C) and a post-read stage of 30 sec at 60°C.

Statistical analysis

Comparisons of the categorical variables between two groups were performed using Chi-squared test; regarding quantitative variables, student's t or the Mann-Whitney test were used for parametrical or non-parametrical distribution, respectively, using GraphPad Prism v.5.0. Statistical analyses, including associations between groups, regarding SNP frequencies and Hardy-Weinberg equilibrium were performed using chi-squared test, Fisher's exact test and odds ratio (OR) with 95% using PLINK v1.9. Genotypic and minor allele frequencies (MAF) were calculated for each SNP among cases and controls. Differences were considered statistically significant with $p < 0.05$. The genetic models used in this study provide an association test in tables of disease-by-genotype, regarding cases versus controls. Based on that, the tests were used as follows: the genotype model (*AA vs Aa vs aa*), dominant model (*AA vs Aa/aa*), recessive model (*aa vs AA/Aa*) and allelic model (*A vs a*) (Clarke et al. 2011). The odds ratio were adjusted according to possible confounding variables as age, viral load and CD4+ T-lymphocytes count through multivariate logistic regression (IBM SPSS Statistics v.22). For the linkage disequilibrium (LD) analysis, it was used a suite of web-based applications (LDproxy) associated to Regulome DB, a platform of NIH (National Institutes of Health – Division of Cancer Epidemiology & Genetics)(https://ldlink.nci.nih.gov/?var=rs3731865&pop=YRI%2BCEU&r2_d=r2&tab=ldproxy), which all data were extracted from the 1000 Genomes Project (<http://www.internationalgenome.org/>) and variant rs numbers were indexed based on dbSNP build 142 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi?build_id=142).

Ethics

The Research Ethics Committee of the Instituto Aggeu Magalhães (CAAE no. 61218816.1.0000.5190) approved the study.

Results

Clinical and hematological features

Table 1 shows the clinical and hematological findings of 193 patients, 102 VL-HIV co-infected and 91 HIV monoinfected, majority of males patients ($p = 0.3674$). Age was similar between groups, 36-39 years ($p = 0.0914$). The groups presented significant differences regarding hemoglobin level ($p < 0.0001$), lymphocyte count ($p = 0.0355$), diarrhea ($p = 0.0362$), HIV viral load ($p = 0.0031$) and CD4+ T-lymphocytes count ($p = 0.0181$). In addition, 59.7% ($p = 0.0071$) VL-HIV co-infected patients had CD4+ T lymphocyte count ≥ 200 cells/mm³, of which 54.3% ($p < 0.0001$) had viral load < 50 copies/mL.

Table 1 Clinical and laboratorial findings of 102 VL-HIV co-infection and 91 HIV monoinfection cases, 2012-2017, Northeastern Brazil.

Clinical and laboratorial findings	VL-HIV co-infection frequencies (%)	HIV monoinfection frequencies (%)	<i>p-value*</i>
Gender			
Male	61	67	0.3674
Mean age (min.-max.) years	36.00 (18-77)	39.00 (18-64)	0.0914
Clinical and laboratorial features			
Hematological features			
Hemoglobin (g/dL)	11.60 (7.970-18.30)	9.285 (5.880-15.60)	< 0.0001
Lymphocyte count (cells/mm ³)	1286 (162.0-4080)	906.0 (53.00-4350)	0.0355
White blood cell count (cells/mm ³)	5050 (510.0-13960)	4380 (867.0-25000)	0.7776
Neutrophils count (cells/mm ³)	2761 (204.0-9850)	2800 (472.0-20400)	0.5069
Irregular fever	68.7	69.2	0.9385
Hepatomegaly	27.1	20.3	0.3910
Splenomegaly	22.9	13	0.1629
Weight loss	67.2	75	0.2910
Cough	56.6	58.9	0.7891
Diarrhea	62.1	44.4	0.0362
Asthenia	41	47.3	0.4461
Pale mucous membranes	52.6	44.2	0.3221
On Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART)	85.7	80.2	0.3478
Viral load (copies/ml)	50 (0-2.091x10 ⁶)	11990 (0-7.855x10 ⁶)	0.0031
Immunological status			
CD4+ T-lymphocytes count (cells/mm ³)	269.5 (5-1501)	134 (1-1460)	0.0181

The statistically significant results are in bold

* Chi-square test or Mann Whitney if necessary

Genotypic and allelic frequencies

The distribution of 11 polymorphisms assayed with the genotypic frequencies attributed between VL-HIV co-infected and HIV monoinfected patients are showed on Table 2. All SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium. Three genetic association models for each polymorphism were assayed: genotype, dominant and recessive models, respectively. The dominant model ($p = 0.0206$, OR 1.8126, 95% CI 1.1050-2.9727) confirmed the association of *SLC11A1* polymorphism (rs3731865) with VL-HIV co-infection. Table 3 shows the frequency distribution of the minor allele between cases and controls. Allelic model G vs C ($p = 0.0347$, OR 1.5645, 95% CI 1.0307-2.3747) confirmed the association of *SLC11A1* polymorphism (rs3731865) with VL-HIV co-infection as well. The G is the wild type allele, conferring susceptibility to visceral leishmaniasis in HIV patients. Dominant and allelic models both confirmed the association between *SLC11A1* polymorphism (rs3731865) with VL-HIV co-infection.

Table 2 Genotyping frequencies of polymorphisms in *LECT2*, *SLC11A1*, *IL4*, *CCL1*, *CCL16* genes in VL-HIV and HIV infected patients.

<i>Chromosome</i>	<i>Gene</i>	<i>VL-HIV</i>	<i>HIV</i>	<i>Genetic models[#]</i>	<i>p-value*</i>	<i>OR (CI 95%)</i>
	<i>LECT2</i>					
	Genotype, n (%)					
5q31.1	rs248158	n = 110	n = 196 ⁺			
	TT	36 (33)	70 (36)	(TT vs. CT vs. CC)	0.6891	-
	CT	59 (54)	95 (48)	(TT vs. CT/CC)	0.6187	1.142 (0.6968-1.8720)
	CC	15 (13)	31 (16)	(TT/CT vs. CC)	0.7392	1.190 (0.6111-2.3170)
5q31.1	rs2526146	n = 107 ⁺	n = 199			
	TT	35 (33)	72 (36)	(TT vs. CT vs. CC)	0.8390	-
	CT	54 (50)	94 (47)	(TT vs. CT/CC)	0.6154	1.166 (0.7096-1.9170)
	CC	18 (17)	33 (17)	(TT/CT vs. CC)	1.0000	1.017 (0.5421-1.9090)
5q31.1	rs2526152	n = 107 ⁺	n = 199			
	TT	30 (28)	60 (30)	(TT vs. CT vs. CC)	0.7527	-
	CT	56 (52)	95 (48)	(TT vs. CT/CC)	0.7926	1.108 (0.6591-1.8620)
	CC	21 (20)	44 (22)	(TT/CT vs. CC)	0.6621	0.8602 (0.4802-1.5410)
5q31.1	rs30740	n = 110	n = 199			
	AA	54 (50)	115 (58)	(AA vs. AG vs. GG)	0.3468	-
	AG	49 (44)	74 (37)	(AA vs. AG/GG)	0.1533	1.420 (0.8892-2.2670)
	GG	7 (6)	10 (5)	(AA/AG vs. GG)	0.6119	1.284 (0.4747-3.4760)

5q31.1	rs4976360	n = 109 ⁺	n = 199			
	TT	30 (28)	74 (37)	(TT vs. AT vs. AA)	0.1784	-
	AT	58 (53)	97 (49)	(TT vs. AT/AA)	0.1016	1.559 (0.9367-2.5940)
	AA	21 (19)	28 (14)	(TT/AT vs. AA)	0.2558	1.457 (0.7827-2.7140)
	<i>SLC11A1</i>					
	Genotype, n (%)					
2q35 - INT4 (469 +14G/C)	rs3731865	n = 110	n = 199			
	GG	77 (70)	112 (56)	(GG vs. CG vs. CC)	0.0539	-
	CG	28 (25)	76 (38)	(GG vs. CG/CC)	0.0206	1.8126 (1.1050-2.9727)
	CC	5 (5)	11 (6)	(GG/CG vs. CC)	0.7946	0.8139 (0.2753-2.4060)
	<i>IL4</i>					
	Genotype, n (%)					
5q31-33	rs2070874	n = 110	n = 199			
	CC	52 (47)	94 (47)	(CC vs. CT vs. TT)	0.9532	-
	CT	47 (43)	87 (44)	(CC vs. CT/TT)	1.0000	0.9985 (0.6262-1.5920)
	TT	11 (10)	18 (9)	(CC/CT vs. TT)	0.8394	1.117 (0.5074-2.4600)
	<i>CCL1</i>					
	Genotype, n (%)					
17q11.2-q23.3	rs159271	n = 110	n = 199			
	CC	87 (79)	160 (80)	(CC vs. CT vs. TT)	0.7020	-
	CT	22 (20)	35 (18)	(CC vs. CT/TT)	0.7692	0.7692 (0.6086-1.9330)
	TT	1 (1)	4 (2)	(CC/CT vs. TT)	0.6587	0.4472 (0.0493-4.0540)

Table 2 (continued)

17q11.2-q23.3	rs159273	n = 109 ⁺	n = 199			
	GG	90 (83)	162 (81)	(GG vs. GT vs. TT)	1.0000	-
	GT	18 (16)	34 (17)	(GG vs. GT/TT)	0.8778	0.9243 (0.5020-1.7020)
	TT	1 (1)	3 (2)	(GG/GT vs. TT)	1.0000	0.6049 (0.06213-5.8900)
	<i>CCL16</i>					
	Genotype, n (%)					
17q11.2-q23.3	rs2063979	n = 110	n = 199			
	CC	37 (34)	64 (32)	(CC vs. CT vs. TT)	0.9022	-
	CT	51 (46)	98 (49)	(CC vs. CT/TT)	0.8012	0.9353 (0.5701-1.5340)
	TT	22 (20)	37 (19)	(CC/CT vs. TT)	0.7644	1.0950 (0.6079-1.9710)
17q11.2-q23.3	rs854680	n = 110	n = 198 ⁺			
	CC	46 (42)	85 (43)	(CC vs. CA vs. AA)	0.4013	-
	CA	57 (52)	92 (46)	(CC vs. CA/AA)	0.9045	1.0470 (0.6528-1.6780)
	AA	7 (6)	21 (11)	(CC/CA vs. AA)	0.3009	0.5728 (0.2354-1.3940)

Table 2 (continued)

The statistically significant results are in bold

#Genetic models: genotypic, dominant and recessive

*Fisher's exact test or chi-square test

⁺Missing genotypes were excluded from analysis

Table 3 Allelic frequencies of polymorphisms in *LECT2*, *SLC11A1*, *IL4*, *CCL1*, *CCL16* genes in VL-HIV and HIV infected patients.

<i>Chromosome</i>	<i>SNP</i>	<i>A1^a</i>	<i>F_A^b</i>	<i>F_U^c</i>	<i>A2^d</i>	<i>p-value*</i>	<i>OR^e</i>	<i>95% CI^f</i>
5q31.1	rs248158	C	0.4045	0.4005	T	0.9222	1.0170	0.7263-1.4240
5q31.1	rs2526146	C	0.4206	0.4020	T	0.6562	1.0800	0.7705-1.5130
5q31.1	rs2526152	C	0.4579	0.4598	T	0.9650	0.9926	0.7111-1.3850
5q31.1	rs30740	A	0.2864	0.2362	G	0.1700	1.2980	0.8939-1.8840
5q31.1	rs4976360	A	0.4587	0.3844	T	0.0730	1.3570	0.9714-1.8960
2q35 - INT4 (469 +14G/C)	rs3731865	C	0.1727	0.2462	G	0.0347	1.5645	1.0307-2.3747
5q31-33	rs2070874	T	0.3136	0.3090	C	0.9060	1.0220	0.7161-1.4580
17q11.2-q23.3	rs159271	T	0.1091	0.1080	C	0.9679	1.0110	0.5956-1.7160
17q11.2-q23.3	rs159273	T	0.0917	0.1005	G	0.7259	0.9040	0.5143-1.5890
17q11.2-q23.3	rs2063979	T	0.4318	0.4322	C	0.9934	0.9986	0.7162-1.3920
17q11.2-q23.3	rs854680	A	0.3227	0.3384	C	0.6927	0.9317	0.6559-1.3230

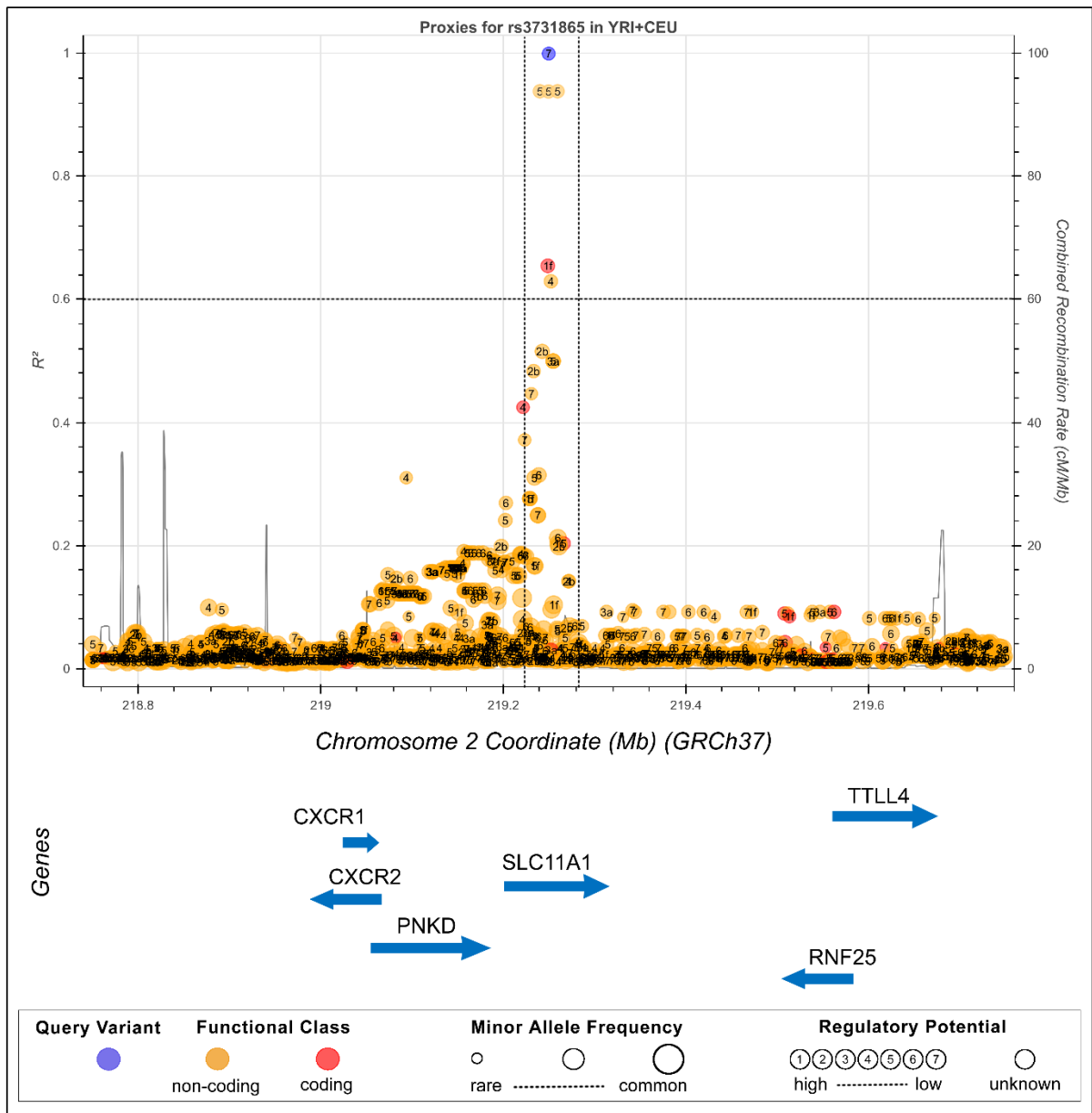
The statistically significant results are in bold *Chi-squared test ^aMinor allele code ^bFrequency of minor allele in cases (VL-HIV)

^cFrequency of minor allele in controls (HIV) ^dMajor allele code ^eOdds ratio ^f95% confidence interval

Linkage disequilibrium

Five SNPs proximal to rs3731865 (rs6734861, rs13011285, rs17228995, rs2276631, rs2290708) in linkage disequilibrium above $r^2 > 0.6$ in CEU and YRI populations are showed on Fig. 1. These five variants are from *SLC11A1* gene, analysis *in silico* using regulome DB showed that these SNPs are in regions with expression quantitative trait loci (eQTL), transcription factor (TF) binding and/or DNAase peak. Regulome DB annotates SNPs with known and predicted regulatory elements in the intergenic regions of the *Homo sapiens* genome.

Figure 1 Analyze of linkage disequilibrium of rs3731865.



Graphic showing proxies of five SNPs in linkage disequilibrium (LD) with the rs3731865 above $r^2 = 0.6$ and recombination rate on 60 cM/Mb. All ID SNPs presented are in Chromosome 2. The (1f) red circle means expression quantitative trait loci (eQTL) + transcription factor (TF) binding/DNAse peak related, however, (4) orange circle means TF binding + DNase peak related and (5) yellow circle means TF binding or DNase peak related. The graph was made in NIH. YRI (Yoruba population) and CEU (North and West European population).

Multivariate logistic regression model for VL-HIV co-infection

In the multivariate analysis, after adjusting the variables for confounding factors, the *SLC11A1* genotype GG was independently associated with susceptibility to VL-HIV co-infection ($p = 0.0050$, OR 3.0395, 95% CI 1.4065-6.5789), increasing the chance in 3.03 times to develop the infection. The presence of the G allele (rs3731865) acted as a susceptible factor for VL in HIV patients in all tested combinations. The CD4+ T-lymphocytes count was also associated with VL-HIV co-infection in the regression model ($p = 0.0030$, OR 0.9980, 95% CI 0.9970-0.9990) (Table 4).

Table 4 Multivariate logistic regression for predictors of susceptibility to VL-HIV co-infection.

<i>Variables</i>	<i>p-value</i>	<i>OR (C.I. 95%)</i>
<i>SLC11A1</i> - rs3731865 (GG)	0.0050	3.0395 (1.4065-6.5789)
Age	0.6840	1.0070 (0.9740-1.0410)
HIV Viral Load	0.3620	1.0000 (1.0000-1.0000)
CD4+ T-lymphocytes count	0.0030	0.9980 (0.9970-0.9990)

The statistically significant results are in bold

Discussion

The present study confirmed the association between *SLC11A1* polymorphism (rs3731865) with visceral leishmaniasis in HIV patients, and G is the wild type allele, conferring susceptibility to disease. This candidate gene study was pioneer evaluating *SLC11A1* (rs3731865) association with VL-HIV co-infection in Latin America. Herein, we approached the clinical, hematological and genetic profiles of these patients.

GWASs were previously made for selecting single nucleotide polymorphisms related to visceral leishmaniasis susceptibility (Blackwell et al. 2009; Jamieson et al. 2007; Jeronimo et al. 2007). To the best of our knowledge, there are no studies approaching candidate genes directly in VL-HIV co-infected populations.

In Sudan, genetic studies at *SLC11A1* (rs3731865) confirmed association with visceral leishmaniasis (Mohamed et al. 2004). However, other association studies have shown that polymorphisms at *SLC11A1* are not related to susceptibility with VL in India (Mehrotra et al. 2011). In Morocco, two polymorphisms were associated with VL in children (Ejghal et al. 2014). In Pakistan, eight polymorphisms were assayed on local population, but none of them shows association with cutaneous leishmaniasis (Sophie et al. 2017). Studies performed on the

American continent described association of *SLC11A1* polymorphisms with VL in Mexico (Ortiz-Flores et al. 2015), however, in Brazil *SLC11A1* polymorphisms seemed not to be linked to cutaneous leishmaniasis (Castellucci et al. 2010). The increasing number of HIV cases in Brazil is worrying, due to risk of developing VL in this group. Therefore, Northeastern Brazil is endemic region for VL-HIV co-infection (Barbosa Júnior et al. 2015; Cavalcanti et al. 2012; Guedes et al. 2018; Lima et al. 2017; Silva et al. 2013).

The biological role of the SLC11A1 protein is related to the control of intracellular pathogens by macrophage activation pathway (Singh et al. 2017). In addition, it is a transmembrane protein of 550 amino acids, localized to the phagosome membrane, regulating the ion transport (Mn^{2+} , Fe^{2+} and Co^{2+}) (Cellier et al. 1994; Ganz 2009; Lang et al. 1997; Vidal et al. 1993). The rs3731865 polymorphism is in intron 4 (469+14G/C), which may interfere in splicing mechanisms that remove these non-coding regions. The presence of genotype GG (rs3731865) in dominant model is related to susceptibility to visceral leishmaniasis in HIV patients, and we suggest that five SNPs at *SLC11A1* in linkage disequilibrium (rs6734861, rs13011285, rs17228995, rs2276631, rs2290708) may alter the gene expression, which does not make possible the phagolysosome formation effectively for *Leishmania* spp. clearance. Recently, a systematic review and meta-analysis confirmed the hypothesis of *SLC11A1* gene be involved in susceptibility to cutaneous and visceral leishmaniasis (Braliou et al. 2019). The aforementioned disclosure highlights the role of host genetic background in infections; however, it is important to notice that environmental, vectors, nutrition and immune status of the host could also contribute to disease progression.

The clinical features of visceral leishmaniasis may appear more aggressive during HIV infection, with atypical symptoms, such as gastrointestinal involvement (stomach, duodenum and colon), which make clinical diagnosis a difficult task (Alvar et al. 1997; Lindoso et al. 2016; Sundar and Rai 2002). Herein, the groups presented significant differences regarding diarrhea presence. Therefore, physicians dealing with HIV patients in VL endemic areas should pay attention to any atypical clinical features during the diagnostic workup.

Our study shows in the multivariate model that the genotype GG (rs3731865) had a chance of 3.03 times to develop VL-HIV independently of others factors, such as age, CD4 and viral load. For our surprise, CD4⁺ T-lymphocytes count was also independently associated with VL-HIV co-infection, and we highlight that case reports described up to now have not showed CD4⁺ T lymphocyte count that could be inherently associated with VL-HIV co-infection (Barbosa Júnior et al. 2015; Cavalcanti et al. 2012; Guedes et al. 2018; Silva et al. 2013). Herein,

we suggest that the high CD4⁺ T lymphocyte count in VL-HIV may be justified because some patients did not have active disease, which the diagnosis of VL was confirmed only by serological tests (DAT, rK39 ICT and/or ELISA). Clinical and hematological features should be associated to the genetic profile of patients for a better understanding of VL-HIV co-infection spectrum. In addition, in the univariate model on table 1, we showed that 19.8 % of controls were not on HAART, which leads to CD4 depletion, increasing the viral load. The use of HAART unregularly may be a risk factor to HIV patients develop VL in the future. Therefore, we recommend case control studies considering this variable.

A study carried out in Rio Grande do Norte, Northeastern Brazil, genotyped 23 polymorphisms related to immune response in VL, finding an association at *IL4* (rs2070874) and another one close to *LECT2* gene cluster (rs30740) to a negative delayed-type hypersensitivity skin test response (DTH-) phenotype (Jeronimo et al. 2007). In Pará, Northern Brazil, a GWAS study suggested that *CCL1* (rs159271 and rs159273) and *CCL16* (rs2063979 and rs854680) are valid candidate susceptibility genes for VL, being related to cytokine expression that control infections (Jamieson et al. 2007). Our study was important due to the pursuit of a possible association in admixture population based on the investigation of a polymorphism at *IL4* (rs2070874), five polymorphisms close to *LECT2* gene cluster (rs248158, rs2526146, rs2526152, rs30740, rs4976360), two polymorphism at *CCL1* (rs159271 and rs159273) and two at *CCL16* (rs2063979 e rs854680), although none of them were associated with VL-HIV co-infection.

Sample size could be considered a limitation of this study, since a larger sample would better represent the genetic polymorphisms in the susceptibility to visceral leishmaniasis in HIV subjects. Furthermore, we encourage that functional studies are necessary for a better understanding of the role played by rs3731854 in macrophage activation and *Leishmania* spp. clearance.

In conclusion, the dominant and allelic models confirmed the association of *SLC11A1* (rs3731865) polymorphism with VL-HIV co-infection, suggesting a possible genetic mechanism involved in susceptibility of VL in HIV patients. These findings can open new therapeutic targets and genetic markers for VL-HIV co-infected population.

Disclosure statement

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest. All authors have approved the final article.

References

- Abass E, Bollig N, Reinhard K, Camara B, Mansour D, Visekruna A, Lohoff M, Steinhoff U (2013) rKLO8, a novel *Leishmania donovani* – derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. PLoS Negl Trop Dis 7:e2322. [https://doi: 10.1371/journal.pntd.0002322](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002322)
- Alemayehu M, Wubshet M, Mesfin N (2016) Magnitude of visceral leishmaniasis and poor treatment outcome among HIV patients: meta-analysis and systematic review. HIV/AIDS (Auckl) 8:75-81. <https://doi.org/10.2147/HIV.S96883>
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J (1997) *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clin Microbiol Rev 10:298-319. <https://doi:10.1128/crm.10.2.298>
- Barbosa Júnior WL, Araújo PS, Andrade LD, Santos AM, Silva MA, Dantas-Torres F, Medeiros Z (2015) Rapid tests and the diagnosis of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome coinfection. Am J Trop Med Hyg 93:967-969. <https://doi: 10.4269/ajtmh.14-0798>
- Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, Mishra A, Mohamed HS, Peacock CS, Raju M, Sundar S, Wilson ME (2009) Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. Parasite Immunol 31:254-266. <https://doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01102.x>
- Braliou GG, Kontou PI, Boleti H, Bagos PG (2019) Susceptibility to leishmaniasis is affected by host *SLC11A1* gene polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. Parasitol Res 118:2329-2342. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06374-y>
- Castellucci L, Jamieson SE, Miller EN, Menezes E, Oliveira J, Magalhães A, Guimarães LH, Lessa M, de Jesus AR, Carvalho EM, Blackwell JM (2010) *CXCR1* and *SLC11A1* polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: a case-control and family-based study. BMC Med Genet 11:10. <https://doi: 10.1186/1471-2350-11-10>
- Cavalcanti AT, Medeiros Z, Lopes F, Andrade LD, Ferreira VD, Magalhães V, Miranda-Filho DB (2012) Diagnosing visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection: a case series study in Pernambuco, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 54:43-47. <https://doi:10.1590/s0036-46652012000100008>
- Cellier M, Govoni G, Vidal S, Kwan T, Groulx N, Liu J, Sanchez F, Skamene E, Schurr E, Gros P (1994) Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. J Exp Med 180:1741-1752. <https://doi:10.1084/jem.180.5.1741>

- Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT (2011) Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc* 6:121-133. [http:// doi: 10.1038/nprot.2010.182](http://doi:10.1038/nprot.2010.182)
- Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J (2006) *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* 123:357-388.
- Diro E, Lynen L, Ritmeijer K, Boelaert M, Hailu A, van Griensven J (2014) Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in East Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2869. <https://doi:10.1371/journal.pntd.0002869>
- Ejghal R, Hida M, Idrissi ML, Hessni AE, Lemrani M (2014) *SLC11A1* polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis in Moroccan patients. *Acta Trop* 140:130-136. [https://doi: 10.1016/j.actatropica.2014.08.013](https://doi:10.1016/j.actatropica.2014.08.013)
- Ganz T (2009) Iron in innate immunity: starve the invaders. *Curr Opin Immunol* 21:63-67. [https://doi: 10.1016/j.coi.2009.01.011](https://doi:10.1016/j.coi.2009.01.011)
- Guedes DL, Medeiros Z, Dionísio da Silva E, Martins de Vasconcelos AV, Santana da Silva M, Lopes da Silva MA, Ramos de Araújo PS, Miranda-Filho (2018) Visceral leishmaniasis in hospitalized HIV-infected patients in Pernambuco, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 99:1541-1546. <https://doi:10.4269/ajtmh.17-0787>
- Jamieson SE, Miller EN, Peacock CS, Fakiola M, Wilson ME, Bales-Holst A, Shaw MA, Silveira F, Shaw JJ, Jeronimo SM, Blackwell JM (2007) Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. *Genes Immun* 8:84-90. <https://doi:10.1038/sj.gene.6364357>
- Jeronimo SM, Holst AK, Jamieson SE, Francis R, Martins DR, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Miller EN, Cordell HJ, Duggal P, Beaty TH, Blackwell JM, Wilson ME (2007) Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. *Genes Immun* 8:539-551. [https://doi: 10.1038/sj.gene.6364422](https://doi:10.1038/sj.gene.6364422)
- Lang T, Prina E, Sibthorpe D, Blackwell JM (1997) *Nramp1* transfection transfers *Ity/Lsh/Bcg*-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. *Infect Immun* 65:380-386.
- Lima ECB, Barbosa Júnior WL, Brito MEF, Melo FL, Brandão Filho SP, Medeiros ZM (2017) Characterization of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in visceral leishmaniasis associated with HIV co-infection in Northeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 59:e48. [https://doi: 10.1590/S1678-9946201759048](https://doi:10.1590/S1678-9946201759048)

- Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury AN, Romero GA, de Sousa-Gomes ML, Santos-Oliveira JR, Rabello A (2014) Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3136. [https://doi: 10.1371/journal.pntd.0003136](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003136)
- Lindoso JA, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CH (2016) Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges. *HIV/AIDS (Auckl)* 8:147-156. [https://doi: 10.2147/HIV.S93789](https://doi.org/10.2147/HIV.S93789)
- Mehrotra S, Oommen J, Mishra A, Sudharshan M, Tiwary P, Jamieson SE, Fakiola M, Rani DS, Thangaraj K, Rai M, Sundar S, Blackwell JM (2011) No evidence for association between *SLC11A1* and visceral leishmaniasis in India. *BMC Med Genet* 12:71. [https://doi: 10.1186/1471-2350-12-71](https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-71)
- Ministério da Saúde (2011) Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Ministério da Saúde, Brasília.
- Ministério da Saúde (2018) Manual técnico para diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças. Ministério da Saúde, Brasília.
- Mishra A, Jha AN, van Tong H, Singh VK, Gomes CE, Singh L, Velavan TP, Thangaraj K (2014) Analysis of genetic variants in the *IL4* promoter and VNTR loci in Indian patients with visceral leishmaniasis. *Hum Immunol* 75:1177-1181. [https://doi: 10.1016/j.humimm.2014.10.007](https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.10.007)
- Mohamed HS, Ibrahim ME, Miller EN, White JK, Cordell HJ, Howson JM, Peacock CS, Khalil EA, El Hassan AM, Blackwell JM (2004) *SLC11A1* (formerly *NRAMP1*) and susceptibility to visceral leishmaniasis in the Sudan. *Eur J Hum Genet* 12:66-74. [https://doi:10.1038/sj.ejhg.5201089](https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201089)
- Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R (2014) Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003021>
- Mukherjee S, Mukhopadhyay D, Ghosh S, Barbhuiya JN, Das NK, Chatterjee M (2016) Decreased frequency and secretion of CD26 promotes disease progression in Indian post kala-azar dermal leishmaniasis. *J Clin Immunol* 36:85-94. [https://doi: 10.1007/s10875-015-0215-8](https://doi.org/10.1007/s10875-015-0215-8)
- Ortiz-Flores A, De la Rosa-López G, Zavaleta-Villa B, Chávez-López S, Pastor-Santiago J, Guzmán-Bracho C, Romero-Valdovinos M, Martínez-Hernández F, Olivo-Díaz A (2015) Association of leishmaniasis with TNF alpha promoter and *SLC11A1* gene polymorphisms

- in patients of two endemic areas in Mexico. *Microbes Infect* 17:387-394. <https://doi:10.1016/j.micinf.2015.01.001>
- Silva ED, Andrade LD, Araújo PS, Silveira VM, Padilha CE, Silva MA, Medeiros ZM (2013) Case study of a patient with HIV-AIDS and visceral leishmaniasis co-infection in multiple episodes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 55:425-428. <https://doi:10.1590/S0036-46652013000600010>
- Singh N, Gedda MR, Tiwari N, Singh SP, Bajpai S, Singh RK (2017) Solute carrier protein family 11 member 1 (Slc11a1) activation efficiently inhibits *Leishmania donovani* survival in host macrophages. *J Parasit Dis* 41:671-677. <https://doi:10.1007/s12639-016-0864-4>
- Singh S (2014) Changing trends in the epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of *Leishmania*-HIV co-infection in India. *Int J Infect Dis* 29:103-112. <https://doi:10.1016/j.ijid.2014.07.011>
- Sophie M, Hameed A, Muneer A, Samdani AJ, Saleem S, Azhar A (2017) *SLC11A1* polymorphisms and host susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Pakistan. *Parasit Vectors* 10:12. <https://doi:10.1186/s13071-016-1934-2>
- Sundar S, Rai M (2002) Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:951-958. <https://doi:10.1128/CDLI.9.5.951-958.2002>
- Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73:469-485. [https://doi:10.1016/0168-9525\(93\)90008-6](https://doi:10.1016/0168-9525(93)90008-6)

8.3 Artigo 3: Higher serum levels of TNF and IL-4 cytokines and low miR-182 expression in VL-HIV co-infected patients

Este artigo é referente aos objetivos específicos “a” e “c” da tese: “Caracterizar do ponto de vista epidemiológico e clinico-laboratorial os grupos LV/HIV e HIV; avaliar os níveis de citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 e identificar o padrão de expressão gênica dos microRNAs hsa-mir182-5p, hsa-mir210-3p e hsa-mir122-3p nos grupos LV/HIV e HIV”. O artigo foi submetido a revista *Parasite Immunology*.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar as citocinas séricas e a expressão de miRNAs em LV/HIV e HIV. Analisamos 113 amostras de soro de pacientes com HIV provenientes de área endêmica para leishmaniose. O diagnóstico de LV foi confirmado em 65 dos 113 pacientes; os grupos LV/HIV e HIV apresentaram diferenças significativas em relação ao nível de hemoglobina ($p < 0,0001$), contagem de linfócitos ($p = 0,0444$), contagem de leucócitos ($p = 0,0108$), perda de peso ($p = 0,0310$), carga viral ($p = 0,0006$) e contagem de linfócitos T CD4+ ($p = 0,0003$). As citocinas tiveram correlações positivas moderadas entre si e o grupo LV/HIV apresentou níveis séricos de TNF e IL-4 significativamente mais elevados ($p < 0,0001$), quando comparados com o HIV. Além disso, a expressão do miR-182 foi significativamente maior no grupo HIV ($p = 0,009$), o miR-210 não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos e nenhuma expressão do miR-122 foi encontrada em ambos os grupos. Juntos, TNF, IL-4 e o miR-182 podem ser úteis como biomarcadores circulatórios para a coinfeção LV/HIV.

Palavras-chave: HIV/Aids. Leishmanioses. Citocina. Perfil de expressão

Title: Higher serum levels of TNF and IL-4 cytokines and low miR-182 expression in VL-HIV co-infected patients

Short running title: Cytokines and microRNAs in VL-HIV

Walter Lins Barbosa Júnior^{1,*}, Alda Maria Justo³, Ana Maria Aguiar dos Santos¹, Virginia Maria Barros de Lorena², Rodrigo Feliciano do Carmo⁴, Fábio Lopes de Melo¹, Luydson Richardson Silva Vasconcelos^{1,3}, Zulma Maria de Medeiros^{1,3}

¹Instituto Aggeu Magalhães, Department of Parasitology Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil

²Instituto Aggeu Magalhães, Department of Immunology, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil

³Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brazil

*Address correspondence to Walter Lins Barbosa Júnior, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Recife, Pernambuco, 50740-465, Brazil. E-mail: walterb716@gmail.com. Telephone: +55 81 97903458

Conflicts of interest statement: The authors declare that they have no conflict of interest. All authors have approved the final article.

Funding statement: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco [FACEPE (APQ 1712-4.01/15)] and Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) [(PAPES VII - Processo (401857/2015-8)].

Author contribution: Fully involved in this research, including data collection, molecular techniques, statistical analysis and writing the manuscript (WL). Clinical and laboratorial data collection from medical records (AJ, AA). Methodology supervising (RC, FM). Methodology supervising and participated in statistical analyses (LR, VL). Study methodology and the

overall conduct of this research (ZM). All authors reviewed and approved the final version of this manuscript.

Abstract

The object of this study was assess serum cytokines and miRNAs expression in VL-HIV and HIV. We analyzed 113 serum samples of HIV patients from endemic area for leishmaniasis. The diagnosis of VL was confirmed in 65 out of 113; VL-HIV and HIV groups presented significant differences regarding hemoglobin level ($p < 0.0001$), lymphocyte count ($p = 0.0444$), white blood cell count ($p = 0.0108$), weight loss ($p = 0.0310$), HIV load ($p = 0.0006$) and CD4+ T-lymphocytes count ($p = 0.0003$). Cytokines had moderate positive correlations among themselves and VL-HIV showed significantly higher serum levels of TNF and IL-4 ($p < 0.0001$), compared with HIV. In addition, miR-182 expression was found to be significantly higher in HIV ($p = 0.009$), miR-210 showed no statically significant difference between groups and none expression of miR-122 was found in both groups. Together, TNF, IL-4 and miR-182 might be useful as circulatory biomarkers to VL-HIV co-infection.

Keywords: HIV/AIDS, leishmaniasis, cytokine, expression profiling

1 INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) caused by *Leishmania infantum* is a life-threatening neglected infectious disease, which affects thousands of people per year. Since the emergence of the human immunodeficiency virus (HIV) was described during the 1980s, a significant number of VL-HIV co-infection cases has been observed worldwide, particularly in Europe, Africa, Asia and Latin America.^{1,2} In Latin America, 93% of VL-HIV co-infection cases have been reported in Brazil, highlighting Northeastern region, where this association has been increasingly noticed.^{3,4}

Immunologically, complex mechanisms related to dysregulation of host response result in *Leishmania*-mediated immune activation and HIV pathogenesis.⁵ *Leishmania* spp. induce a switch from Th1 (IFN- γ , TNF and IL-2) to Th2 (IL-4, IL-6 and IL-10) cytokine profiles, increasing susceptibility to severe leishmaniasis in HIV individuals.⁶⁻¹⁰ In this way, it is important to emphasize that VL clinical features may appear during HIV more aggressively and serum cytokine concentration may be related to clinical and laboratorial profile of patients.^{3,11,12,13} Moreover, early diagnosis of VL-HIV co-infection is very important, because

it improves the prognosis and the outcome of infection by early treatment;^{14,15} thus, biomarkers for disease detection are essential.

MicroRNAs (miRNAs) are stable molecules of about 22 nucleotides in length that act on regulation of gene expression and, consequently, the abundance of these small RNAs make them potential biomarkers.¹⁶ In addition, these molecules may be secreted by cells, remaining in the extracellular environment or being grasped by different cell groups.¹⁷ Moreover, overexpression of miRNAs may alter the translation of genes, altering the cell phenotype.¹⁸ Therefore, miRNAs influence molecular pathways, controlling innate and adaptive responses to pathogens.¹⁹ In infectious diseases, there are few studies that have evaluated the role of miRNAs in pathology. MiRNAs in the bloodstream have been described for several diseases, whose expression profiles vary according to degree and progression of the pathology.²⁰

Based on that, miR-182 have been described as noninvasive biomarkers for several infectious diseases, as HIV,²¹ HCV,²² sepsis,²³ and schistosomiasis.^{24,25} Specifically for leishmaniasis, miR-210 upregulation plays a role in apoptotic signaling pathway²⁶ and miR-122 downregulation is related to VL pathogenesis.²⁷

Therefore, to the best of our knowledge, this study is pioneer evaluating correlation among cytokines and miRNA in VL-HIV co-infection spectrum. Accordingly, the current study was designed to assess IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2 serum cytokines and miR-182, miR-210 and miR-122 expression profiles as potential biomarkers in VL-HIV co-infection.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Samples

Initially, were enrolled 113 HIV patients from Northeastern Brazil. Serum samples were collected with informed consent over the course of six years (2012-2017), being stored at -80 °C until use at the Doenças Transmissíveis Laboratory, Instituto Aggeu Magalhães (IAM-Fiocruz).

2.2 Diagnosis

To compose VL-HIV co-infected group, we selected 65 serum samples from patients confirmed by one or more diagnostic methods that represented active infection: bone marrow

cytology, conventional PCR with primers targeting the non-coding region found in the SSU rRNA of *L. infantum*, and KAtex (Kalon Biological, Guildford, UK).^{28,29} Control group comprised a total of 48 serum samples from HIV patients confirmed by two HIV rapid tests (TR1 and TR2), with viral load and CD4+ T-lymphocytes count collected;³⁰ however, all negative to VL diagnostic methods mentioned above and serological methods, as direct agglutination test [DAT (Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands)], rK39 immunochromatographic test [rK39 ICT (DiaMed-IT LEISH[®]; DiaMed AG, Cressier-sur-Morat, Switzerland)] and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).³¹

2.3 Clinical and laboratorial features

Clinical and laboratorial features were collected from medical records, investigating the following variables: hemoglobin, leucocyte count, irregular fever, hepatomegaly, splenomegaly, weight loss, cough, diarrhea, asthenia, pale mucous membranes, highly active antiretroviral therapy (HAART) use, HIV viral load and CD4+ T-lymphocytes count. It is important to emphasize that some clinical and laboratorial data were missing in the medical records.

2.4 Cytokines

IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2 serum levels were analyzed by flow cytometry using FACSCalibur[™] and BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine kit (BD Biosciences, Rockville, MD, USA) in accordance with the manufacture's recommendation. Standard curves were derived from cytokines standards. Cytokine levels were expressed as pg/mL. BD CBA data were analyzed by FCAP Array Software v3.0.

2.5 miRNAs extraction and RT-qPCR

miRNAs were isolated from serum using the mirRNAeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Thereafter, it was prepared a mix to obtain cDNA using a T100[™] Thermal Cycler instrument (Bio-Rad, Germany), according to TaqMan[®] Advanced miRNA cDNA Synthesis kit (Applied Biosystems, CA, USA) manufacturer's recommendation. Subsequently, expression assays were performed by real time quantitative PCR (qPCR) using TaqMan[®] Advanced MicroRNA Assays [probes: has-miR-182-5p (477935_mir), hsa-miR-

210-3p (477970_mir), hsa-miR-122-3p (477874_mir), hsa-miR-24-3p (477992_mir) and cel-miR-39-3p (478293_mir)] (Applied Biosystems, CA, USA). For normalization, exogenous control used was Cel mir-39 miRVana miRNA mimic (ID: MC10956) (Ambion® Life Technologies, USA) and endogenous control targeted was hsa-mir-24.

Expression assays were run on QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA), under the following conditions: Hold stage of 20 sec at 95°C, followed by 40 cycles at PCR stage of 1 sec at 95°C followed by 20 sec at 60°C.

Calculation of the relative quantification was carried out using the comparative cycle threshold (Ct) method. Fold change of each miRNA was calculated using $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Data were analyzed by the ExpressionSuite v1.1 software (Applied Biosystems, CA, USA).

2.6 Statistical methods

Statistical analysis for comparisons of the two groups were performed using Chi-square test or the Mann-Whitney test for parametrically or non-parametrically distributed data using GraphPad Prism v.5.0. Correlation between numerical variables was evaluated using the Spearman-rho method. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

2.7 Ethics approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Therefore, serum samples were previously collected with patients' informed consent to compose case and control groups for this study. The Research Ethics Committee of the Instituto Aggeu Magalhães (CAAE no. 61218816.1.0000.5190) approved the study.

3 RESULTS

3.1 Patients' clinical and laboratorial features

Table 1 shows the clinical and laboratorial features of 106 out of 113 patients, 64 VL-HIV co-infected and 42 HIV monoinfected, majority of male patients ($p = 0.6116$). Age was

similar between co-infected and monoinfected groups, 36 versus 35 years, respectively ($p = 0.7090$). These groups presented significant differences regarding hemoglobin level ($p < 0.0001$), lymphocyte count ($p = 0.0444$), white blood cell count ($p = 0.0108$), weight loss ($p = 0.0310$), HIV load ($p = 0.0006$) and CD4+ T-lymphocytes count ($p = 0.0003$).

TABLE 1 Clinical and laboratorial features of 64 VL-HIV and 42 HIV patients, 2012-2017, Northeastern Brazil.

Features of the study population	VL-HIV co-infection frequencies (%)	HIV mono-infection frequencies – %	<i>p-value*</i>
Gender			
Male	59.3	64.3	0.6116
Mean age (min.-max.) years	36 (19-58)	35 (21-64)	0.7090
Clinical and laboratorial features			
Laboratorial features			
Hemoglobin (g/dL)	12.95 (8.30-16.60)	9.025 (5.88-13.40)	< 0.0001
Lymphocyte count (cells/mm ³)	1350 (250.0-3350)	884.5 (178.00-4330)	0.0444
White blood cell count (cells/mm ³)	5700 (510.00-12230)	3425 (867.00-11640)	0.0108
Neutrophils count (cells/mm ³)	3331 (204.00-9850)	1875 (472.00-9777)	0.1846
Irregular fever	46.9	69	0.0543
Hepatomegaly	30.4	23.1	0.3144
Splenomegaly	29.2	12.5	0.1203
Weight loss	54.8	78.6	0.0310
Cough	0.5	57.1	0.5856
Diarrhea	63.6	46.3	0.1901
Asthenia	36.7	35.7	0.9339
Pale mucous membranes	39.3	36.6	0.8202
On Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART)	92.7	81	0.1151
Viral load (copies/ml)	40 (40-4.571x10 ⁵)	15151 (0-2.272x10 ⁶)	0.0006
Immunological status			
CD4+ T-lymphocytes count (cells/mm ³)	507 (10-1501)	153.50 (6-875)	0.0003

The statistically significant results are in bold

* Chi-square test or Mann-Whitney if necessary

3.2 Serum levels of cytokines between VL-HIV and HIV groups

Table 2 shows the serum levels of IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2 cytokines, which were elevated in VL-HIV co-infected patients, compared with those in HIV patients, except IL-6 levels. Co-infected patients showed significantly higher serum levels of TNF and IL-4, compared with levels in HIV patients ($p < 0.0001$) (Figure 1B, E).

TABLE 2 Serum levels of cytokines between VL-HIV and HIV groups.

Cytokines	VL-HIV (n=65)	HIV (n=48)	<i>p</i> -value*
IFN- γ (pg/mL)	5.55 (0.89-40.16)	5.27 (3.39-65.01)	0.23
TNF (pg/mL)	4.88 (3.10-6.65)	4.37 (1.60-6.86)	< 0.0001
IL-10 (pg/mL)	6.65 (4.22-174.79)	6.53 (4.91-27.66)	0.23
IL-6 (pg/mL)	17.96 (3.99-330.20)	19.85 (5.20-389.40)	0.62
IL-4 (pg/mL)	5.15 (1.99-12.11)	3.94 (1.99-5.89)	< 0.0001
IL-2 (pg/mL)	2.77 (0.54-8.75)	2.34 (0.00-5.03)	0.05

Data are median pg/mL

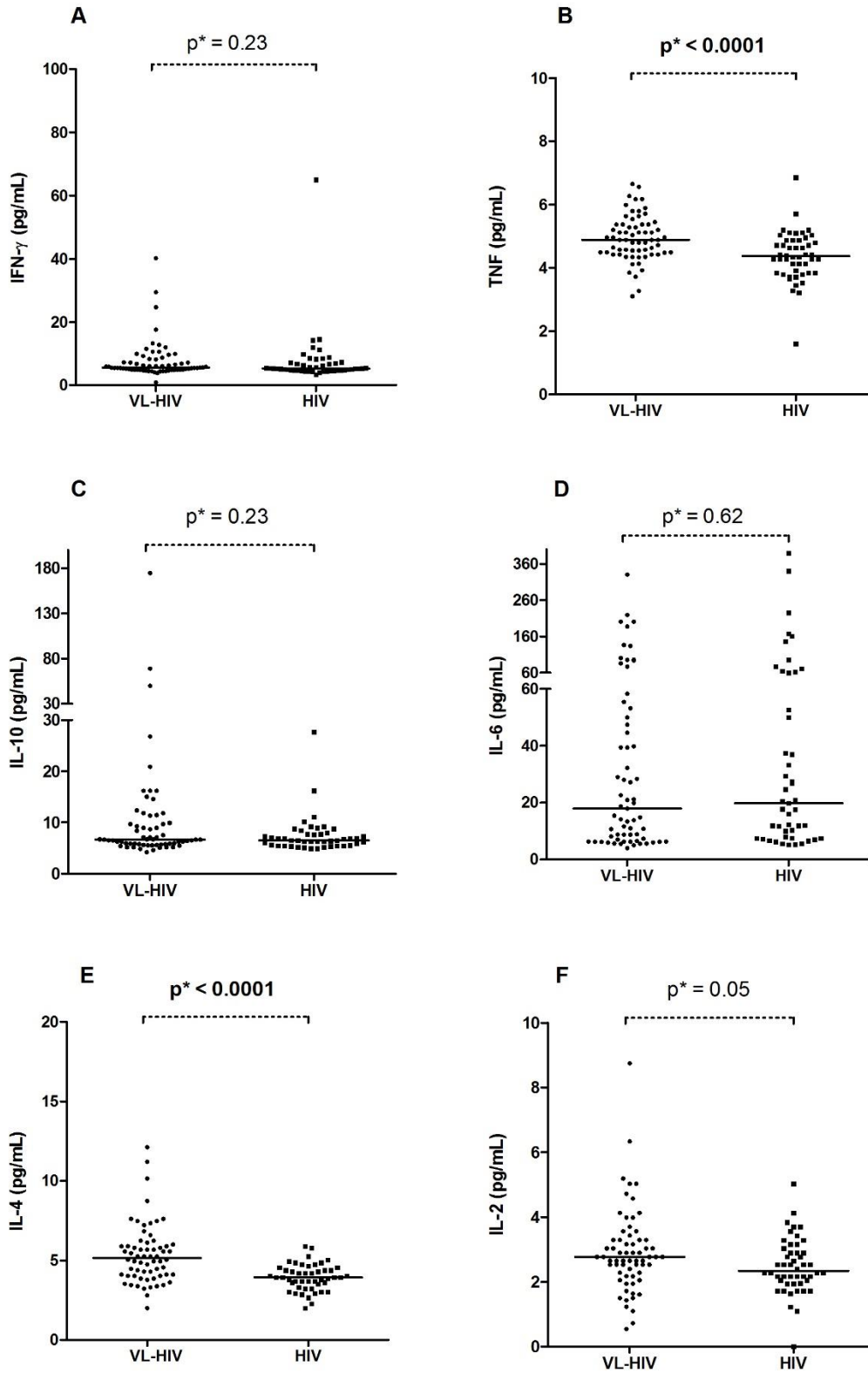
The statistically significant results are in bold

*Mann-Whitney test

3.3 miR-182, miR-210 and miR-122 expression profile

On comparison between VL-HIV co-infected and HIV patients, miR-182 expression was found to be significantly higher in HIV group ($p = 0.009$). miR-210 showed no statically significant difference between groups ($p = 0.068$) (Figure 2). In this study, none expression of miR-122 was found in both groups.

FIGURE 1 Association of serum levels of cytokines between VL-HIV and HIV groups.

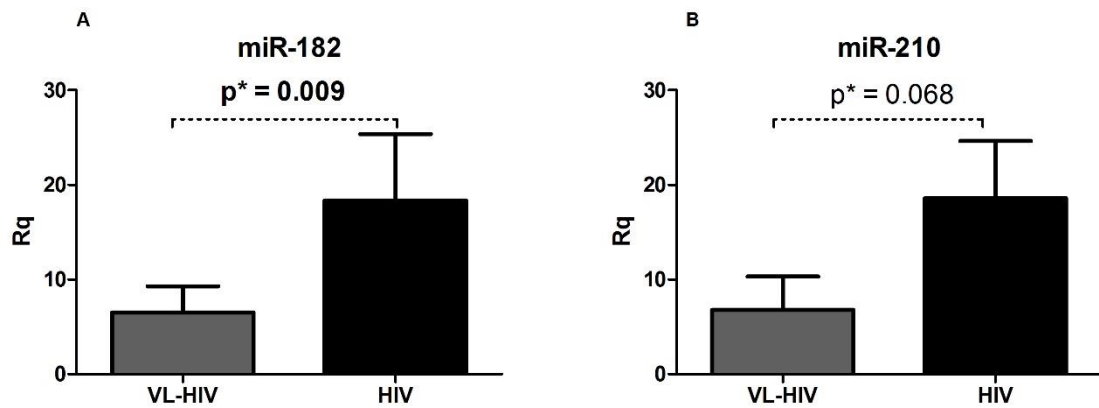


The statistically significant results are in bold

The horizontal bars indicate the median values

* Mann-Whitney test

FIGURE 2 Relative quantification of miR-210 and miR-182 between VL-HIV and HIV groups.



Data expressed as mean \pm SEM

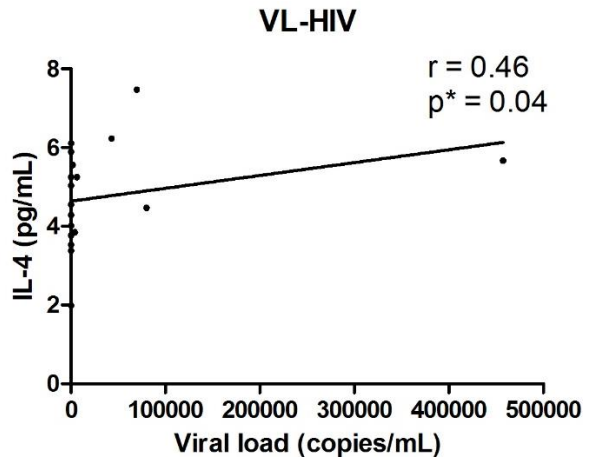
The statistically significant results are in bold

*Mann-Whitney test

3.4 Correlation between IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2 serum cytokines, relative quantification of miR-182, clinical and laboratory features between VL-HIV and HIV groups

On examination of VL-HIV co-infected patients, our results show that cytokines had moderate positive correlations among themselves. These include IFN- γ and IL-10 ($r = 0.48$), IFN- γ and IL-6 ($r = 0.62$), TNF and IL-2 ($r = 0.51$) and IL-6 and IL-10 ($r = 0.65$) (Table 3). In addition, regarding cytokines and laboratorial features, there was only moderate positive correlation between IL-4 and viral load ($r = 0.46$) (Figure 3). However, HIV-infected patients had moderate positive correlations between IL-6 and IFN- γ ($r = 0.56$) and IL-4 and TNF ($r = 0.47$) (Table 4). There were found no statistically significant correlation among cytokine levels and relative quantification of miR-182 (Figure 4) and cytokine levels and clinical features for each group (data not shown).

FIGURE 3 Positive correlation between IL-4 levels and viral load in VL-HIV group.



Correlation were evaluated using the Spearman-rho method

TABLE 3 Correlation between IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2 serum cytokines in VL-HIV group.

	IFN- γ (pg/mL)	TNF (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)
IFN- γ (pg/mL)	-	-	-	-	-	-
TNF (pg/mL)	0.30*	-	-	-	-	-
IL-10 (pg/mL)	0.48**	0.25*	-	-	-	-
IL-6 (pg/mL)	0.62**	0.26*	0.65**	-	-	-
IL-4 (pg/mL)	0.19	0.15	0.21	0.18	-	-
IL-2 (pg/mL)	0.35**	0.51**	0.28*	0.40**	0.25	-

Correlation were evaluated using the Spearman-rho method

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

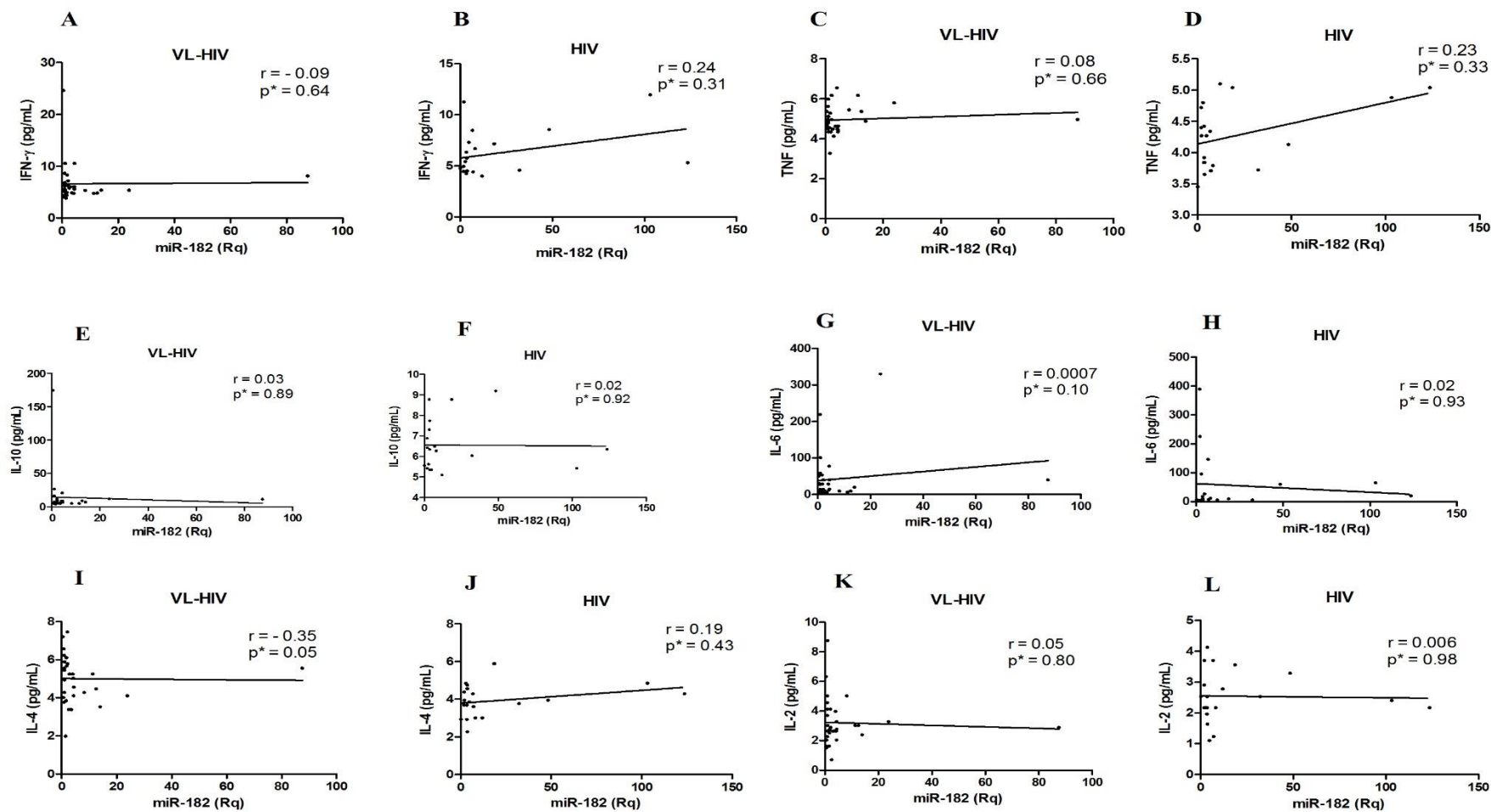
TABLE 4 Correlation between IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2 serum cytokines in HIV group.

	IFN- γ (pg/mL)	TNF (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)
IFN- γ (pg/mL)	-	-	-	-	-	-
TNF (pg/mL)	0.37**	-	-	-	-	-
IL-10 (pg/mL)	0.43**	0.15	-	-	-	-
IL-6 (pg/mL)	0.56**	0.34*	0.36*	-	-	-
IL-4 (pg/mL)	0.38**	0.47**	0.05	0.18	-	-
IL-2 (pg/mL)	0.38**	0.20	0.38*	0.30*	0.29	-

Correlation were evaluated using the Spearman-rho method

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

FIGURE 4 Correlation between IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2 serum cytokines and relative quantification of miR-182 in VL-HIV and HIV groups.



Correlation were evaluated using the Spearman-rho method

4 DISCUSSION

The present study found that VL-HIV co-infected patients had significantly higher serum levels of TNF and IL-4 cytokines and low miR-182 expression compared with HIV patients. In addition, there was only moderate positive correlation between IL-4 and viral load in VL-HIV group. Herein, we approached the clinical and laboratorial profiles of these patients to enhance our findings.

Regarding clinical and laboratorial findings, there was a higher weight loss in HIV patients. Otherwise, studies observed that VL-HIV co-infected present weight loss to a greater proportion than HIV patients, this divergence may be explained because the HIV group of our study is mainly composed by patients with AIDS.^{15,32} A study investigating VL-HIV stressed a significant increase of viral load into co-infected patients,⁸ which corroborates our results. Furthermore, the same study showed lower CD4+ T-lymphocytes count into this group. However, up to now, case reports and cross-sectional studies have not described CD4+ T-lymphocytes count that could be associated with VL-HIV co-infection in Brazil.^{14,15,33,34} Therefore, it is difficult to achieve a consensus comparing studies with VL-HIV population, due to the complex spectrum of clinical and laboratorial features.

In addition, serum cytokines concentration may be related to clinical and laboratorial findings, which provide new insights in VL spectrum.¹³ Studies suggest that IL-6 is associated with anemia, indicated by hemoglobin concentration, being a consequence of systemic inflammation in VL patients.^{13,35}

Our results show that VL-HIV co-infected patients had significantly differences with regard to serum levels of TNF and IL-4. A study showed that VL-HIV co-infected patients had higher mean serum levels of TNF and IFN- γ compared with HIV patients.⁸ The HIV replication in *Leishmania* parasited CD4+ T cells is dependent on TNF, favoring the disease progression.^{5,8} Moreover, it was detected significantly higher levels of IL-4 in the *L. infantum*/HIV group with regard to HIV group in cell cultures,⁹ which strengthen our main findings. Up to now, few studies using different biological samples (e.g. cell cultures, serum) to cytokine analyses have been described in VL-HIV co-infected patients; therefore, they lead to preliminary finds and incipient interpretation of immunopathogenesis into this group.

We found a moderate positive correlation between IL-6 and IL-10, IFN- γ and IL-6, IFN- γ and IL-10 and TNF and IL-2, being most related to pathogenesis in VL-HIV co-infection. Commonly, VL-HIV patients demonstrate persistently elevated Th2 cytokines in serum.⁷

Moreover, a study showed IL-6 as a cytokine highly positively and independently associated with IL-10 and that one was moderate positive correlated to IFN- γ in VL patients from Northeastern Brazil.¹³ It is well-known that IL-10 inhibits Th1 response, impairing an effective immune response by TNF in VL leading to pronounced immunosuppression;^{5,13} that aforementioned information justify low mean serum levels of TNF found in this study. Although IL-2 cytokine is a potent inducer of Th1 response, it may activate *Leishmania*, favoring the progression of HIV-infection.^{7,36} In fact, our survey shows low concentrations of IL-2, and we suggest our patients have an amplified Th2 response that mitigates a Th1 response. Thus, *Leishmania* spp. play a determining role in the pathogenesis of HIV-infection, which induce Th2 cytokine production, increasing susceptibility to severe leishmaniasis infection.^{6,10} Therefore, we suggest that IL-6 and IL-10 still maintain a synergic role for VL pathogenesis even if HIV virus is present.

Furthermore, viral load is related to TNF and IL-6 cytokines, which they are in high levels during VL.^{5,8,37} In fact, immune dysregulation observed during HIV-infection is influenced by *L. infantum*, which induces secretion of TNF and IL-6 in human dendritic cell and CD4+ T cultures, which enhances HIV production when both pathogens reside inside the same cell type.^{5,38,39} However, higher serum levels of IFN- γ and increased production of IL-4 has been associated with CD4+ T lymphocytes count depletion in HIV-infected patients.^{9,40} Herein, we suggest that moderate positive correlation between IL-4 and viral load may be justified by balance of Th1/Th2 responses. Moreover, we suggest that IL-6, IFN- γ , IL-4 and TNF positively correlated here in HIV-infection may be up/down-regulated sharply if acquired *L. infantum*-infection, leading to AIDS progression in a shorter time. Interestingly, our study shows low IL-4 serum levels for both groups, and it may be related of some sort to high CD4+ T-lymphocytes count found here.

However, low positive correlations among some cytokines described herein may be justified by immunosuppression, during HIV-infection in VL patients, affecting the Th1/Th2 cytokine profile.⁸ VL cytokine profiles related to resistance and susceptibility comprise a complicate network of regulatory interactions,^{41,42} and it is important to stress that, in VL-HIV co-infection, these mechanisms are still more complex.

In this study, miR-182 expression was found to be significantly higher in HIV group, which it has already been studied as non invasive biomarker for several infectious diseases.²²⁻²⁵ It was verified that on schistosomiasis IL-4 cytokine up regulates the miR-182 expression in Th2-associated Treg cells, which mitigates IL-2 secretion in a Th1 response.²⁴ A study presented IL-4 cytokine significantly elevated in HIV infected subjects.⁴³ Therefore, we

suggest that a similar miR-182 mechanism may occur based on reduction of IL-2 levels, being related to HIV pathogenesis and replication, favoring AIDS progression. However, low miR-182 expression in VL-HIV co-infection may be due to *L. infantum* presence inside cells, impairing IL-4 signaling pathway interactions on miR-182 promoter region resulting in its downregulation. Therefore, more studies are needed to clarify miR-182 signaling pathway, so that it might be used as circulatory biomarker for VL-HIV.

Particularly on leishmaniasis, it has been described that miR-210 regulates biologic processes related to cancer and infectious diseases.^{18,26} During *Leishmania major* infection, miR-210 transcription is largely controlled by a transcriptional factor directly related to hypoxia (HIF-1 α). This microRNA blocks apoptosis because it affects the abundance of procaspase-3, an apoptotic protein; thus, *L. major* survives inside macrophages.²⁶ Interestingly, higher levels of miR-210 were found in HIV patients, though, no statically significant difference was found between groups (p=0.068).

In order to better understanding of immunopathogenesis, we suggest the need to reproduce studies with large sample sizes testing clinical samples of diverse populations to assess the role of miR-182 as biomarker on *L. infantum*, on mono-infection and co-infection models, in different endemic areas for this specie.

In summary, in this study we have shown that TNF and IL-4 are related to VL-HIV co-infection, being IL-4, as much as TNF and IL-6, related to viral load as well. Positive correlation among IL-6 and IL-10, IFN- γ and IL-6, IFN- γ and IL-10 and TNF and IL-2 are related to pathogenesis in VL-HIV co-infection; however, IL-6 and IFN- γ and IL-4 and TNF positively correlated may lead to AIDS progression in HIV patients if *Leishmania*-infection is present. In addition, miR-182 might be useful as circulatory biomarker for VL-HIV co-infection.

Acknowledgements: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco [FACEPE (APQ 1712-4.01/15)] and Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) [(PAPES VII - Processo (401857/2015-8)].

References

1. Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res.* 2006;123:357-388.
2. Alemayehu M, Wubshet M, Mesfin N. Magnitude of visceral leishmaniasis and poor treatment outcome among HIV patients: meta-analysis and systematic review. *HIV AIDS (Auckl).* 2016;8:75-81.
3. Lindoso JA, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CH. Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges. *HIV AIDS (Auckl).* 2016;8:147-156.
4. Pan American Health Organization (PAHO), Leishmaniasis: Epidemiological report of the Americas, Information on leishmaniasis, PAHO/WHO. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754&lang=pt. Accessed August 26, 2019.
5. Okwor I, Uzonna JE. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunol Res.* 2013;56:163-171.
6. Bernier R, Turco SJ, Olivier M, Tremblay M. Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoïd cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J Virol.* 1995;69:7282-7285.
7. Capopardo B, Nigro L, Preiser W, et al. Prolonged Th2 cell activation and increased viral replication in HIV-*Leishmania* co-infected patients despite treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90:434-435.
8. Medrano FJ, Rey C, Leal M, et al. Dynamics of serum cytokines in patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection. *Clin Exp Immunol.* 1998;114:403-407.
9. Nigro L, Cacopardo B, Preiser W, et al. *In vitro* production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from subjects coinfectèd with human immunodeficiency virus and *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60:142-145.
10. Ezra N, Ochoa MT, Craft N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Global Infect Dis.* 2010;2:248-257.
11. 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.
12. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:951-958.

13. Costa DL, Rocha RL, Carvalho RMA, et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health*. 2013;107:78-87.
14. Barbosa Júnior WL, Araújo PSR, Andrade LD, et al. Rapid tests and the diagnosis of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus/ acquired immunodeficiency syndrome coinfection. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93:967-969.
15. Guedes DL, Medeiros Z, Dionísio da Silva E, et al. Visceral leishmaniasis in hospitalized HIV-infected patients in Pernambuco, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;99:1541-1546.
16. Adams BD, Kasinski AL, Slack SJ. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. *Curr Biol*. 2014;24:R762-R776.
17. Sundarbose K, Kartha RV, Subramanian S. MicroRNAs as biomarkers in cancer. *Diagnostics (Basel)*. 2013;3:84-104.
18. Bavelloni A, Ramazzotti G, Poli A, et al. MiRNA-210: a current overview. *Anticancer Res*. 2017;37:6511-6521.
19. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:111–122.
20. Larrea E, Sole C, Manterola L, et al. New concepts in cancer biomarkers: circulating miRNAs in liquid biopsies. *Int J Mol Sci*. 2016;17:E627.
21. Chen XY, Zhang HS, Wu TC, Sang WW, Ruan Z. Down-regulation of NAMPT expression by miR-182 is involved in Tat-induced HIV-1 long terminal repeat (LTR) transactivation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45:292-298.
22. Shaheen NMH, Zayed N, Riad NM, et al. Role of circulating miR-182 and miR-150 as biomarkers for cirrhosis and hepatocellular carcinoma post HCV infection in Egyptian patients. *Virus Res*. 2018;255:77-84.
23. Ojha R, Nandani R, Pandey RK, Mishra A, Prajapati VK. Emerging role of circulating microRNA in the diagnosis of human infectious diseases. *J Cell Physiol*. 2019;234:1030-1043.
24. Kelada S, Sethupathy P, Okoye IS, et al. miR-182 and miR-10a are key regulators of Treg specialisation and stability during *Schistosoma* and *Leishmania*-associated inflammation. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003451.
25. Huang Y, Fan X, Tao R, et al. Effect of miR-182 on hepatic fibrosis induced by *Schistosomiasis japonica* by targeting *FOXO1* through *PI3K/AKT* signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2018;233:6693-6704.

26. Lemaire J, Mkannez G, Guerfali FZ, et al. MicroRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2478.
27. Descoteaux A, Moradin N, Arango Duque G. *Leishmania* dices away cholesterol for survival. *Cell Host Microbe*. 2013;13:245-247.
28. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV, first ed., Ministério da Saúde, Brasília, 2015.
29. Lima ECB, Barbosa Júnior WL, Brito MEF, Melo FL, Brandão Filho SP, Medeiros ZM. Characterization of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in visceral leishmaniasis associated with HIV co-infection in Northeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017;59:e48.
30. Ministério da Saúde. Manual técnico para diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças, fourth ed., Ministério da Saúde, Brasília, 2018.
31. Abass E, Bollig N, Reinhard K, et al. rKLO8, a novel *Leishmania donovani* – derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2322.
32. Lindoso JAL, Moreira CHV, Cunha MA, Queiroz IT. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV AIDS (Auckl)*. 2018;10:193-201.
33. Cavalcanti AT, Medeiros Z, Lopes F, et al. Diagnosing visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection: a case series study in Pernambuco, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012;54:43-47.
34. Silva ED, Andrade LD, Araújo PS, et al. Case study of a patient with HIV-AIDS and visceral leishmaniasis co-infection in multiple episodes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55:425-428.
35. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. 2013;101:2461–2463.
36. Bossolasco S, Nozza S, Gaiera G, Bestetti A, Lazzarin A, Cinque P. Lack of immune recovery in HIV/*Leishmania* co-infection treated with human recombinant IL-2. *AIDS*. 2007;21:1223-1225.
37. Ito M, Baba M, Sato A, et al. Tumor necrosis factor enhances replication of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;158:307-312.

38. Zhao C, Papadopoulou B, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clin Immunol.* 2004;113:81-88.
39. Garg R, Barat C, Ouellet M, Lodge R, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF-alpha. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3:e441.
40. Clerici M, Hakim FT, Venzon DJ, et al. Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest.* 1993;91:759–765.
41. Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;51:229-242.
42. Babiker DT, Bakhiet SM, Mukhtar MM. *Leishmania donovani* influenced cytokines and Toll-like receptors expression among Sudanese visceral leishmaniasis patients. *Parasite Immunol.* 2015;37:417-425.
43. Osuji FN, Onyenekwe CC, Ahaneku JE, Ukibe NR. The effects of highly active antiretroviral therapy on the serum levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in HIV infected subjects. *J Biomed Sci.* 2018;25:88.

9 CONCLUSÕES

O **Artigo 1** da tese corresponde ao primeiro estudo em Pernambuco que realizou a caracterização molecular da espécie *Leishmania (L.) infantum chagasi* em uma paciente coinfectada LV/HIV. Dessa forma, revelou que não apenas a caracterização clínica e laboratorial do paciente são suficientes para a compreensão do espectro da coinfeção LV/HIV, mas também a caracterização das espécies de *Leishmania*, pois poderá direcionar medidas mais precisas de controle da doença, favorecendo o prognóstico e permitindo o tratamento adequado dos pacientes.

O **Artigo 2** destacou que os modelos genéticos dominante e alélico confirmaram a associação do polimorfismo no gene *SLC11A1* (rs3731865) com a coinfeção LV/HIV, sugerindo a existência de um mecanismo genético envolvido na susceptibilidade para LV em pacientes HIV.

O **Artigo 3** apresenta TNF e IL-4 como citocinas relacionados à coinfeção LV/HIV, estando os níveis de IL-4 também relacionados à carga viral. Além disso, reitera que TNF, IL-4 e miR-182 poderiam ser utilizados como biomarcadores circulatórios para a coinfeção LV/HIV.

Dessa forma, são necessários estudos funcionais que explorem os polimorfismos genéticos, em especial o *SLC11A1* (rs3731865), visando a avaliação do papel do SNP na estrutura da proteína. Ademais, papel da citocinas TNF e IL-4, juntamente a avaliação da expressão de seus respectivos mRNAs e do miR-182, deverão ser avaliados em diferentes populações, visando a compreensão do efeito imunogenético e epigenético no desenvolvimento das manifestações clínicas, otimizando a terapêutica para melhor subsidiar o prognóstico dos pacientes coinfectados LV/HIV.

REFERÊNCIAS

- ABASS, E. *et al.* Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: Comparison of different serological tests in three endemic regions. **PLoS One**, São Francisco, v.10, p. 1-13, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0116408>. Acesso em: 12 maio 2018.
- ADAMS, B.; KASINSKI, A.; SLACK, F. Aberrant regulation and function of MicroRNAs in cancer. **Current Biology**, Londres, v. 24, p. 762-776, 2014.
- ALBUQUERQUE, S. C. G. *et al.* The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 8, p. 1-11, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01437/full> Acesso em: 17 nov. 2018.
- ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA, P. *et al.* HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in central-west Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, p. 692-697, 2010.
- ALLAN, M. Z. *et al.* PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. **Tropical Medicine International Health**, Oxford, v. 14, p. 499-503, 2009.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis and human immunodeficiency virus co-infection, the first 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, p. 298-319, 1997.
- ALVAR, J. *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 21, p.334–359, 2008.
- ALVARENGA, D. G. *et al.* Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 43, p. 194-197, 2010.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, Londres, v. 431, p. 350-355, 2004.
- ANDRIAENSEN, W. *et al.* Immunomodulatory therapy of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-coinfected patients. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 8, p. 1-16, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01943/full>. Acesso em: 2 jan. 2019.
- ANTINORI, S. *et al.* Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.44, p. 1602–1610, 2007.
- ARONSON, N. *et al.* Diagnosis and treatment of Leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical

Medicine and Hygiene (ASTMH). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 96, p. 24-45, 2017.

ARORA, S. K. *et al.* An epitope-specific PCR test for diagnosis of *Leishmania donovani* infections. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Chandigarh, v. 102, p. 41-45, 2008.

ASSIS, T. *et al.* Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 17, p. 107-116, 2008.

ATES, Ö. *et al.* NRAMP1 (*SLC11A1*) gene polymorphisms that correlate with autoimmune versus infectious disease susceptibility in tuberculosis and rheumatoid arthritis. **International Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 16, p. 15-19, 2009.

ATTAR, Z. *et al.* Latex Agglutination Test for the Urinary Antigens in Visceral Leishmaniasis. **Acta Tropica**, Basel, v. 78, p. 11-16, 2001.

BABIKER, Z. O. *et al.* Utility of lymph node aspiration in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 76, p. 689-693, 2007.

BARBOSA JÚNIOR, W. L. **Uso do teste rápido no diagnóstico da coinfeção leishmaniose visceral e HIV-aids no Estado de Pernambuco**. 2013. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, 2013.

BARBOSA JÚNIOR, W. L. *et al.* Rapid tests and the diagnosis of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus/ acquired immunodeficiency syndrome coinfection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 93, p. 967-969, 2015.

BARDESKAR, N. S.; MANIA-PRAMANIK, J. HIV and host immunogenetics: unraveling the role of HLA-C. **HLA**, Hanover, v. 88, p. 221-231, 2016.

BAVELLONI, A. *et al.* MiRNA-210: a current overview. **Anticancer Research**, Atenas, v. 37, p. 6511-6521, 2017.

BECTON, DICKINSON AND COMPANY BD BIOSCIENCES. **BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit**: Instruction Manual. San Jose: BD, c2014. Disponível em: <https://wwwbdbiosciences.com/ds/pm/others/23-12381.pdf>. Acesso em: 17 out. 2018.

BERMAN, J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. **Indian Journal of Medical Research**, Nova Delhi, v. 123, p. 289-294, 2006.

BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 46, p. 128-134, 2013.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, Londres, v. 447, p. 396-398, 2007.

BLACKWELL, J. M. *et al.* Immunogenetics of leishmanial and mycobacterial infections: the Belem Family Study, **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences**, Londres, v. 352, p. 1331-1345, 1997.

BLACKWELL, J. M. *et al.* Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, p. 254-266, 2009.

BORGES, A. S. *et al.* Concomitância de leishmanioses e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV): estudo de quatro casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 32, p. 713-719, 1999.

BRALIOU, G. G. *et al.* Susceptibility to leishmaniasis is affected by host *SLC11A1* gene polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. **Parasitology Research**, Berlim, v. 118, p. 2329-2342, 2019.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006.

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

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual técnico para diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2018.

BUCHETON, B. *et al.* Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population: candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region. **Genes and Immunology**, Basingstoke, v. 4, p. 104-109, 2003.

BURNS, J. M. *et al.* Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 775-779, 1993.

CALICH, L. *et al.* Relato de um caso de calazar em paciente com AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 24, p. 64, 1991.

CARNAUBA, D. *et al.* Atypical disseminated leishmaniasis similar to post-kalazar dermal leishmaniasis in a Brazilian AIDS patient infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*: a case report. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 13, p. 504-507, 2009.

CARRANZA-TAMAYO C. O. *et al.* Prevalence of *Leishmania* infection in adult HIV/AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasilia, Federal District, Brazil. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v.103, p. 743–748, 2009.

CASTELLUCCI, L. *et al.* *CXCR1* and *SLC11A1* polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: a case-control and family-based study. **BMC Medical Genetics**, Londres, v. 11, p. 1-8, 2010. Disponível em: <https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-11-10>. Acesso em: 11 out. 2017.

CAVALCANTI, A. *et al.* Diagnosing visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection: a case series study in Pernambuco, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 54, p. 43-47, 2012.

CELLIER, M. *et al.* Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. **Journal of Experimental Medicine**, Nova Iorque, v. 180, p. 1741-1752, 1994.

CHAPPUIS, F. *et al.* A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **British Medical Journal**, Londres, v. 333, p.1-5, 2006. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/333/7571/723.long>. Acesso em: 21 ago. 2016.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews**, Londres, v. 5, p.873-882, 2007.

CHEN, X. Y. *et al.* Down-regulation of NAMPT expression by miR-182 is involved in Tat-induced HIV-1 long terminal repeat (LTR) transactivation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 45, p. 292-298, 2013.

CLERICI, M. *et al.* Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. **Journal of Clinical Investigation**, Nova Iorque, v. 91, p. 759–765, 1993.

CORTES, S. J. C. **Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal**. 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

COSTA, C. H. *et al.* Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.43, p.386-392, 2010.

COSTA, D. L. *et al.* Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and Global Health**, Edimburgo, v.107, p. 78-87, 2013.

COTA, G. F.; SOUZA M. R.; RABELLO, A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIVpatients: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 5, p.1-8, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001153>. Acesso em: 17 fev. 2017.

COTA, G. F. *et al.* The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 6, p. 1-11, 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001665>. Acesso em: 17 fev. 2017.

COTA, G. F. *et al.* Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 89, p.570–577, 2013.

COTA, G. F. *et al.* *Leishmania*-HIV co-infection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 8, p.1-7, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002816>. Acesso em: 17 fev. 2017.

CRUZ, I. *et al.* A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 96, suppl. 1, p.s185–s189, 2002.

CRUZ, I. *et al.* *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. **Indian Journal of Medical Research**, Nova Delhi, v. 123, p. 357-388, 2006.

D'ETTORRE, G. *et al.* Central role of interleukin-15 in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients with visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, Basel, v. 99, p. 83-87, 2006.

DAHER, E. F. *et al.* Clinical and epidemiological features of visceral leishmaniasis and HIV co-infection in fifteen patients from Brazil. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 95, p. 652–655, 2009.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 117-118, 2006.

DANTAS-TORRES, F; BRANDÃO-FILHO, S. P. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, p. 352-356, 2006.

DEDET, J. P.; PRATLONG, F. *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Cincinnati, v. 47, p. 37–39, 2000.

DENIAU, M. *et al.* The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.97, p.15-33, 2003.

DESCOTEAUX, A; MORADIN, N.; DUQUE, G. A. *Leishmania* dices away cholesterol for survival. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 13, p. 245-247, 2013.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, p. 305-318, 2004.

DIEHL, A. R. S. *et al.* Microscopy and polymerase chain reaction detection of *Leishmania chagasi* in the pleural and ascitic fluid of a patient with AIDS: case report and review of diagnosis and therapy of visceral leishmaniasis. **Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, Ontário, v. 15, p. 231-234, 2004.

DING, J. *et al.* Association of gene polymorphism of *SDF1 (CXCR12)* with susceptibility to HIV-1 infection and AIDS disease progression: A meta-analysis. **PLoS One**, São Francisco, v. 13, p. 1-13, 2018. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0191930>. Acesso em: 3 mar. 2019.

DINIZ, L. F. B; SOUZA, C. D. F; CARMO, R. F. C. Epidemiology of human visceral leishmaniasis in the urban centers of the lower-middle São Francisco Valley, Brazilian semiarid region, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 51, p. 461-466, 2018.

DIRO, E. *et al.* Visceral leishmaniasis and HIV co-infection in East Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 8, p. 1-10, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002869>. Acesso em: 6 jun. 2016.

DONG, M. J. *et al.* Research progress in the function of microRNA-182. **Acta Physiologica Sinica**, Pequim, v. 68, p. 107-113, 2016.

DRUZIAN, A. F. *et al.* Risk factors for death from visceral leishmaniasis in an urban area of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 9, p. 1-11, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003982>. Acesso em: 25 jul. 2017

DUFRESNE, S. D. *et al.* BRCA1 and BRCA2 mutation screening using SmartCycler II high-resolution melt curve analysis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine (1926)**, Chicago, v. 130, p. 185-187, 2006.

DUXBURY, R. E.; SADUN, E. H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 13, p. 525-529, 1964.

EGGER, G. *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, Londres, v. 429, p. 457-463, 2004.

EJGHAL, R. *et al.* *SLC11A1* polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis in Moroccan patients. **Acta Tropica**, Basel, v. 140, p. 130-136, 2014.

EL HARITH, A. *et al.* A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 80, p. 583-587, 1986.

EPIDEMIOLOGICAL REPORT OF THE AMERICAS. LEISHMANIASES. Washington: Organização Pan-Americana de Saúde, 7 Mar. 2019. Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/Leishreport2019_eng.pdf?sequence=9&isAllowed=y. Acesso em: 2 ago. 2019.

EZRA, N.; OCHOA, M. T.; CRAFT, N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, Tampa, v. 2, p. 248-257, 2010.

FALLON, P. G. *et al.* Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, p. 2585–2591, 2000.

FEITOSA, M. F. *et al.* Genetic causes involved in *Leishmania chagasi* infection in northeastern Brazil. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, p. 1-5, 1999. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47571999000100001. Acesso em: 16 jul. 2018.

FERNADES COTARELO, M. J. *et al.* Effect of highly active antiretroviral therapy on the incidence and clinical manifestations of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus infected patients. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.37, p.973–977, 2003.

FERREIRA, E. *et al.* Visceral leishmaniasis in a Brazilian child infected perinatally with human immunodeficiency virus. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 20, p. 224–226, 2001.

FRADE, A. F. **Polimorfismo genético em citocinas com impacto no desenvolvimento e progressão da leishmaniose visceral em indivíduos de áreas endêmicas do Maranhão e Piauí**. 2010. Tese (Doutorado em Alergia e Imunopatologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FRADE, A. F. Visceral leishmaniasis and genetic susceptibility. **Revista da Biologia**, São Paulo, v. 6, p. 22-25, 2011.

GALLUZZI, L. *et al.* *Leishmania infantum* induces mild unfolded protein response in infected macrophages. **PLoS One**, São Francisco, v. 11, p. 1-19, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0168339>. Acesso em: 22 set. 2018.

GANZ, T. Iron in innate immunity: starve the invaders. **Current Opinion in Immunology**, Filadélfia, v. 21, p. 63-67, 2009.

GAVGANI. *et al.* KAtex antigen-detection test as a diagnostic tool for latent visceral leishmaniasis cases. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.7, p.852-859, 2008.

GHOSH, J. *et al.* *Leishmania donovani* targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 13, p. 277-288, 2013.

GOLETTI, D. *et al.* Interleukin (IL)-4 inhibits phorbol-ester induced HIV-1 expression in chronically infected U1 cells independently from the autocrine effect of endogenous

tumour necrosis factor- α , IL-1 β , and IL-1 receptor antagonist. **Cytokine**, San Diego, v. 17, p. 28–35, 2002.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil, quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, p.338-349, 2004.

GUEDES, D. L. *et al.* Visceral leishmaniasis in hospitalized HIV-infected patients in Pernambuco, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 99, p. 1541-1546, 2018.

GUERIN, P. J. *et al.* Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, Nova Iorque, v. 2, p. 494–501, 2002.

GYAN, B. A. *et al.* Allelic polymorphisms in the repeat and promoter regions of the interleukin-4 gene and malaria severity in Ghanaian children. **Clinical and Experimental Immunology**, Londres, v. 138, p. 145–150, 2004.

HA, T. Y. MicroRNAs in human diseases: from cancer to cardiovascular disease. **Immune Network**, Seoul, v. 11, p.135-154, 2011.

HANDMAN, E; ELSO, C; FOOTE, S. Genes and susceptibility to leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, Londres, v. 59, p. 1-72, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065308X05590018?via%3Dihub>. Acesso em: 17 out. 2018.

HARRIS, K. *et al.* Aprataxin, poly-ADP ribose polymerase 1 (PARP-1) and apurinic endonuclease 1 (APE1) function together to protect the genome against oxidative damage. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 18, p. 4102-4117, 2009.

HORST, R. T. *et al.* Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: The influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 46, p. 1702-1709, 2008.

HUANG, Y. *et al.* Effect of miR-182 on hepatic fibrosis induced by *Schistosomiasis japonica* by targeting *FOXO1* through *PI3K/AKT* signaling pathway. **Journal of Cellular Physiology**, Filadélfia, v. 233, p. 6693-6704, 2018.

JAMIESON, S. E. *et al.* Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. **Genes and Immunity**, Basingstoke, v. 8, p. 84-90, 2007.

JERONIMO, S. M. *et al.* Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. **Genes and Immunity**, Basingstoke, v. 8, p. 539–551, 2007a.

JERONIMO, S. M. *et al.* Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genome wide scan. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 196, 1261-1269, 2007b.

JHA, A. N. *et al.* IL-4 haplotype -590T, -34T and intron-3 VNTR R2 is associated with reduced malaria risk among ancestral indian tribal populations. **PLoS One**, São Francisco, v. 7, p. 1-12, 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0048136>. Acesso em: 22 abr. 2017.

JOSEPH, S. B. *et al.* Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. **Nature Medicine**, Nova Iorque, v. 9, p. 213–219, 2003.

KELADA, S. *et al.* miR-182 and miR-10a are key regulators of Treg specialisation and stability during *Schistosoma* and *Leishmania*-associated inflammation. **PLoS Pathogens**, São Francisco, v. 9, p. 1-19, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003451>. Acesso em: 26 set. 2017.

LACHAUD, L. *et al.* Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis with special reference to AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, p. 236-240, 2000.

LACHAUD, L. *et al.* Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, p. 210-215, 2002.

LAL, C. S. *et al.* Hypocholesterolemia and increased triglyceride in pediatric visceral leishmaniasis. **International Journal of Clinical Chemistry and Medical Biochemistry**, Amsterdã, v. 382, p. 151-153, 2007.

LANG, T. *et al.* *Nramp1* transfection transfers *Ity/Lsh/Bcg*-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, p. 380–386, 1997.

LARREA, E. *et al.* New concepts in cancer biomarkers: circulating miRNAs in liquid biopsies. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, p. 627, 2016.

LEMAIRE, J. *et al.* MicroRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 7, p. 1-13, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002478>. Acesso em: 16 set. 2016.

LEUNG, A. K.; SHARP, P. A. MicroRNA functions in stress responses. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 40, p. 205–215, 2010.

LIMA, E. C. B. *et al.* Characterization of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in visceral leishmaniasis associated with HIV co-infection in Northeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 59, p. 1-5, 2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652017005000505&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 06 jan. 2018.

LIMA JUNIOR, M. S. C. *et al.* Sensitivity of PCR and real-time PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Hong Kong, v. 3, p. 10-15, 2013.

LINDOSO, J. A. *et al.* Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 8, p. 1-9, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003136>. Acesso em: 15 nov. 2017.

LINDOSO, J. A. *et al.* Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges. **HIV/AIDS-Research and Palliative Care**, Filadélfia, v. 8, p. 147-156, 2016.

LINDOSO, J. A. *et al.* Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. **HIV/AIDS-Research and Palliative Care**, Filadélfia, v. 10, p. 193-201, 2018.

LISI, S. *et al.* Infection with *Leishmania infantum* inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 52, p. 211-217, 2005.

LIU, R. *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, Cambridge, v. 86, p. 367-377, 1996.

LOMA, A. *et al.* Leishmaniasis or AIDS? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 79, p. 421-422, 1985.

LUCK, K. *et al.* Putting into practice domain-linear motif interaction prediction for exploration of protein networks. **PLoS One**, São Francisco, v. 6, p. 1-16, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0025376>. Acesso em: 17 nov. 2017.

LUKES, J. *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 9735-9380, 2007.

MACHADO, A. A. *et al.* Novos casos de leishmaniose associados a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 29, p. 26, 1996.

MAGALHÃES, F. B. **Identificação e avaliação de novos antígenos recombinantes para o diagnóstico da Leishmaniose visceral humana e canina**. 2007. 161 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

MAIA, Z. *et al.* Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6 p. 1-8, 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001484>. Acesso em: 26 maio 2016.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 2941-2947, 2008.

MALAFAIA, G. Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, p. 587–596, 2009.

MARY, C. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 5249-5255, 2004.

MAURICIO, I. L. *et al.* The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, p. 188-189, 2000.

MEDRANO, F. J. *et al.* The role of serology in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type-1. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.59, p.155-162, 1998.

MEHROTRA, S. *et al.* No evidence for association between *SLC11A1* and visceral leishmaniasis in India. **BMC Medical Genetics**, Londres, v. 12, p. 1-7, 2011. Disponível em: <https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-12-71>. Acesso em: 17 nov. 2018.

MENEZES-SOUZA, D. *et al.* Higher expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 chemokines in the skin associated with parasite density in canine visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 6, p. 1-11, 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001566>. Acesso em: 11 jun. 2017.

MILANO, S. *et al.* IL-15 in human visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **Clinical and Experimental Immunology**, Londres, v. 127, p. 360-365, 2002.

MIRA, J. A. *et al.* Frequency of visceral leishmaniasis relapses in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.70, p.298–301, 2004.

MISHRA, A. *et al.* Analysis of genetic variants in the IL4 promoter and VNTR loci in Indian patients with visceral leishmaniasis. **Human Immunology**, Nova Iorque, v. 75, p. 1177-1181, 2014.

MOHAMED, H. S. *et al.* Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in the Sudan: linkage and association with IL4 and IFNGR1. **Genes and Immunity**, Basingstoke, v. 4, p. 351-355, 2003.

MOHAMED, H. S. *et al.* *SLC11A1* (formerly *NRAMP1*) and susceptibility to visceral leishmaniasis in the Sudan. **European Journal of Human Genetics**, Londres, v. 12, p. 66-74, 2004.

MOLINA, R. *et al.* HIV and the transmission of *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Liverpool, v. 97, p. 29-45, 2003.

MONGE-MAILLO, B. *et al.* Visceral leishmaniasis and HIV co-infection in the Mediterranean region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 8, p. 1-8, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003021>. Acesso em: 18 set. 2016.

MUSSO, T. *et al.* IL-10 enhances CCL2 release and chemotaxis induced by CCL16 in human monocytes. **International Journal of Immunopathology and Immunology**, Chieti, v. 18, p. 339-349, 2005.

NASCIMENTO, M. S. L. *et al.* Naturally *Leishmania infantum*-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdã, v. 153, p. 202-208, 2013.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (Estados Unidos). Division of Cancer Epidemiology & Genetics. **LDproxy**. Disponível em: https://ldlink.nci.nih.gov/?var=rs3731865&pop=YRI%2BCEU&r2_d=r2&tab=ldproxy. Acesso em: 2 set. 2018.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2012.

NUNO-MARQUES, *et al.* Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana na era da terapêutica antiretroviral de alta eficácia. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v. 20, p. 291-298, 2007.

NUSSBAUM, R.L.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Thompson & Thompson: Genética Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.

O'CONNELL, R. M. *et al.* Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. **Nature Reviews-Immunology**, Londres, v. 10, p. 111-122, 2010.

OJHA, R. *et al.* Emerging role of circulating microRNA in the diagnosis of human infectious diseases. **Journal of Cellular Physiology**, Filadélfia, v. 234, p. 1030-1043, 2019.

OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. **Immunologic Research**, Basel, v. 56, p. 163-171, 2013.

OLIVEIRA, J. M. *et al.* Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.43, p.188-193, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection. **Addis Ababa**, Naribi, p. 20-22, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control of the leishmaniasis**, Genebra: OMS, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly Epidemiological Record**, Genebra, v. 91, p. 287-296, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Weekly epidemiological record**, Genebra: OMS, 2017.

- ORSINI, M. *et al.* Identification of *Leishmania chagasi* from skin in *Leishmania*/HIV co-infection: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 35, p. 259-262, 2002.
- ORTIZ-FLORES, A. *et al.* Association of leishmaniasis with TNF alpha promoter and *SLC11A1* gene polymorphisms in patients of two endemic areas in Mexico. **Microbes and Infection**, Paris, v. 17, p. 387-394, 2015.
- PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; GOMES, Y. M. Comparasion of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Bauru, v. 16, p. 537-542, 2010.
- PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, Londres, v. 5, p. 1-10, 2015. Disponível em: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-015-0021-2>. Acesso em: 11 out. 2018.
- PAREDES, R. *et al.* Leishmaniasis in HIV infection. **Journal of Postgraduate Medicine**, Mumbai, v. 49, p. 39-49, 2003.
- PEACOCK, C. S. *et al.* Genetic epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. **Genetic Epidemiology**, Cambridge, v. 20, p. 383-396, 2001.
- PESCHANSKY, V. J; WAHLESTEDT, C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. **Epigenetics**, Londres, v. 9, p. 3-12, 2014.
- PINTADO, V.; LOPES-VELEZ, R. Visceral leishmaniasis associated with human immunodeficiency virus infection. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 19, p. 353-357, 2001.
- POLANCO, C. *et al.* Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions. A possible mechanism to resolve this paradox. **Genetics**, Bethesda, v.149, p. 243-256, 1998.
- PONCHEL, F. *et al.* Real-Time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements; gene amplifications and micro gene deletions. **BMC Biotechnology**, Londres, v. 3, p. 18, 2003.
- RABELLO, A. *et al.* *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 1, p.17-28, 2003.
- REY, L. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- RIERA, C. *et al.* Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* co-infection: value in diagnosis and post-treatment follow up. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlim, v. 23, p. 899-904, 2004.

- RIERA, C. *et al.* Value of culture and nested polymerase chain reaction of blood in the prediction of relapses in patients co-infected with leishmania and human immunodeficiency virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 73, p.1012–1015, 2005.
- ROCKMAN, M. V. *et al.* Positive selection on a human-specific transcription factor binding site regulating *IL4* expression. **Current Biology**, Londres, v. 13, p. 2118–2123, 2003.
- ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America-a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 2, p. 1-17, 2010. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000584>. Acesso em: 14 nov. 2017.
- RUHLAND, A.; LEAL, N.; KIMA, P. E. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 84-86, 2007.
- SACKS, D. L. *et al.* An analysis of T cell responsiveness in Indian Kala-azar. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 138, p. 908-913, 1987.
- SARKARI, B. *et al.* Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. **Acta Tropical**, Basileia, v. 82, p. 339–348, 2002.
- SCHÖNIAN, G. *et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Nova Iorque, v. 47, p. 349–358, 2003.
- SHAHEEN, N. M. H. *et al.* Role of circulating miR-182 and miR-150 as biomarkers for cirrhosis and hepatocellular carcinoma post HCV infection in Egyptian patients. **Virus Research**, Amsterdã, v. 255, p. 77-84, 2018.
- SILVA, E. S. *et al.* Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 285-291, 2001.
- SILVA, E. S. *et al.* Visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) brasiliensis* in a patient infected with HIV. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 44, p. 145-149, 2002.
- SILVA, E. D. *et al.* Case study of a patient with HIV-AIDS and visceral leishmaniasis co-infection in multiple episodes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 55, p. 425-428, 2013.
- SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, Nova Delhi, v. 123, p. 311-330, 2006.
- SINGH, D. *et al.* The rK39 strip test is non-predictor of clinical status for kalazar. **BMC Research Notes**, Londres, v. 2, p. 1-4, 2009. Disponível em: <https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-2-187>. Acesso em: 7 out. 2018.

SINGH, S. Changing trends in the epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of *Leishmania*-HIV co-infection in India. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 29, p. 103-112, 2014.

SOPHIE, M. *et al.* SLC11A1 polymorphisms and host susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Pakistan. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 10, p. 1-9, 2017. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1934-2>. Acesso em: 11 nov. 2018.

SOUSA-GOMES, M. L. *et al.* Coinfecção *Leishmania*-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 20, p. 519-526, 2011.

STUMPFOVA, Z. *et al.* MicroRNA profiling of activated and tolerogenic human dendritic cells. **Mediators of Inflammation**, Nova Iorque, v. 2014, p. 1-10, 2014. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/259689/>. Acesso em: 9 jan. 2018.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, p. 951-958, 2002.

SUNDAR, S. *et al.* Evaluation of a new rapid immunochromatographic diagnostic test (Diamed-it Leish) for Indian visceral leishmaniasis and PKDL. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, p. 3-7, 2003.

SUNDAR, S. *et al.* Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. **Tropical Medicine International Health**, Oxford, v. 12, p. 284–289, 2007.

SUNDARBOSE, K.; KARTHA, R.; SUBRAMANIAN, S. MicroRNAs as biomarkers in cancer. **Diagnostics**, Basel, v. 3, p. 84-104, 2013.

TALMI-FRANK, D. *et al.* Detection and identification of Old World *Leishmania* by high resolution melt analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 4, p. 1-5, 2010. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000581>. Acesso em: 17 nov. 2017.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **TaqMan Assays**. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>. Acesso em: 17 out. 2018.

VIANA, G. M. C. *et al.* Leishmaniose visceral e síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Relato de um caso. **Revista do Instituto Brasileiro de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 36, p. 384-386, 1994.

VIDAL, S. M. *et al.* Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. **Cell**, Cambridge, v. 73, p. 469–485, 1993.

WEI, J. W. *et al.* Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (review). **Oncology Reports**, Atenas, v. 37, p. 3-9, 2017.

WEIRATHER, J. L. *et al.* Comprehensive candidate gene analysis for symptomatic or asymptomatic outcomes of *Leishmania infantum* infection in Brazil. **Annals of Human Genetics**, Londres, v. 81, p. 41-48, 2017.

WEN, J.; FRIEDMAN, J. R. miR-122 regulates hepatic lipid metabolism and tumor. **The Journal of Clinical Investigation**, Nova Iorque, v. 122, p. 2773-2776, 2012.

WHITE, L. *et al.* Different effects of IL-21 and IL-15 on perforin expression, lysosomal degranulation, and proliferation in CD8 T cells of patients with human immunodeficiency virus-1 (HIV). **Blood**, Washington, v. 109, p. 3873-3880, 2007.

WOLDAY, D. *et al.* HIV-1 inhibits *Leishmania*-induced cell proliferation but not production of interleukin-6 and tumor necrosis factor alfa. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 39, p. 380-386, 1994.

WOLFF, B. J. *et al.* Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR and highresolution melt analysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, p. 3542-3549, 2008.

XU, S. *et al.* MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, p. 25053-25066, 2007.

YAMAGOE, S., MIZUNO, S., SUZUKI, K. Molecular cloning of human and bovine *LECT2* having a neutrophil chemotactic activity and its specific expression in the liver. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdã, v. 1396, p. 105-113, 1998a.

YAMAGOE, S. *et al.* Molecular cloning, structural characterization, and chromosomal mapping of the human *LECT2* gene. **Genomics**, San Diego, v. 48, p. 324-329, 1998b.

ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: "Estudo de fatores genéticos e epigenéticos envolvidos na susceptibilidade a Leishmaniose Visceral em pacientes coinfectados com HIV."

Pesquisador responsável: Walter Lins Barbosa Júnior

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 20/10/2016

Registro no CAAE: 61218816.1.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 1.870.364

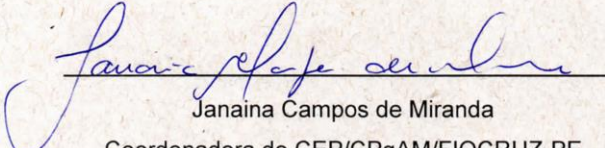
PARECER


O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

O CEP/CPqAM reforça a necessidade de entrega de relatórios parcial e final, em cumprimento a resolução 466/12, capítulo XI, artigo 2d.

Recife, 20 de dezembro de 2016.


 Janaina Campos de Miranda
 Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE


 Janaina Campos de Miranda
 Pesquisadora em Saúde Pública
 Coordenadora
 Mat. SIAPE 464777
 CEP / CPqAM / FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
 CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
 Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
 Recife - PE - Brasil
 comitedeetica@cpqam.fiocruz.br


 Centro de Pesquisas
AGGEU
 MAGALHÃES


FIOCRUZ
 Ministério da Saúde