



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS E SAÚDE**

RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA

**PERFIL LIPÍDICO EM INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL
COINFECTADOS PELO HIV**

Teresina
2022

RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA

**PERFIL LIPÍDICO EM INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL
COINFECTADOS PELO HIV**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do programa para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa

Teresina
2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCS
Serviço de Processamento Técnico

S586p Silva, Renata Vieira de Sousa.
Perfil lipídico em indivíduos com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV / Renata Vieira de Sousa Silva. – 2022.
74 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa.

Bibliografia

1. Leishmaniose visceral. 2. *Leishmania infantum*. 3. HIV coinfeção. 4. Anfotericina B. 5. Resistência a drogas. 6. Metabolismo lipídico. I. Costa, Carlos Henrique Nery. II. Título.

CDD 614.534

RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA

**PERFIL LIPÍDICO EM INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL
COINFECTADOS PELO HIV**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do programa para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa

Trabalho aprovado em: 21/12/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa
Presidente
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr. Kelsen Dantas Eulálio
Membro externo ao programa (1º Examinador)
Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP

Prof^ª. Dr^ª. Débora Cavalcante Braz
Membro externo ao programa (2º Examinadora)
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof^ª. Dr^ª. Dorcas Lamounier Costa
Membro interno ao programa (Suplente)
Universidade Federal do Piauí – UFPI

DEDICATÓRIA

A **Deus** pela vida, saúde e proteção.

Aos meus pais **Elineusa Vieira de Sousa Silva** e **José Vidal Alves da Silva** (*in memoriam*) por todo amor e dedicação à minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Universidade Federal do Piauí (UFPI)** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde** pela oferta do curso e bons professores. À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa concedida. Ao **Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella** e o **Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses** pela estrutura oferecida para a execução desta pesquisa.

Ao **Dr. Carlos Henrique Nery Costa** e à **Dra. Dorcas Lamounier Costa** pela oportunidade de trabalho e o mais importante: aprender. A **Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana** e a **técnica Jenicer Kasumi Umada Yokoyama Yasunaka** da **Universidade Estadual de São Paulo (USP)** do Laboratório de Leishmanioses pela oportunidade de aprender sobre cultura de *Leishmanias* e viabilidade celular.

Aos meus pais, **Elineusa Vieira de Sousa Silva** e **José Vidal Alves da Silva** (*in memoriam*), ao meu irmão **Ênio Vieira Alves da Silva** e à minha família, especialmente **Cleide Maria Vieira de Sousa**, **Kleyton Alves da Silva**, **Suelyly Vieira Mesquita Rocha**, **Antônio da Silva Rocha**, **Suennia Vieira Mesquita**, **Soraya Crisnammani Costa**, **Teresa Raquel da Costa**, **Anna Klara Alves da Silva** e ao nosso grupo do Whatssapp pelo amor e incentivo.

Aos meus amigos **Laís Silva Lima**, **Ângelo Antônio Rodrigues Irene da Silva**, **Wharleyne Araújo de Macêdo Chaves**, **Tatiana de Sousa Pires**, **Dávila Cristina Cavalcante de Oliveira**, **Ronaldo Moraes Costa**, **Joaquim Eliano Dutra Bezerra**, **Priscila Martins Mendes**, **Ingrid Carvalho Lima**, **Débora Ribeiro de Mesquita**, **Raimundo Leoberto Torres de Sousa**, **Nayra Denise Pessoa do Monte**, **Naiane de Carvalho Alves**, **Jailson Pereira da Silva**, **Brenda Bulsara Costa Evangelista**, **Tatiane de Sousa Neves** e **Emille Andrade Sousa** pelo incentivo. As minhas amigas de classe e de laboratório, **Mísia Joyner de Sousa Dias Monteiro** e **Rebeca Deolindo Mavignier** pelo companheirismo e risos. Ao **Jhonata Lino Machado** pelo amor e apoio. À **Edilene Oliveira Soares** pela ajuda e acolhimento. Ao senhor **José Mendes de Sousa** pelo auxílio com os prontuários dos participantes desta pesquisa.

Aos meus companheiros de laboratório: **Vivianne da Silva Carvalho**, **Jossuely Rocha Mendes**, **Michelle Maria Ferreira Lopes**, **Débora Cavalcante Braz**, **Lydia Raquel Nunes de França**, **Amanda Miranda da Silva**, **Iara Katrynne Fonsêca Oliveira**, **Nathália Batista de Andrade**, **Layana Pachêco de Araújo Albuquerque**, **Maria Nauside Pessoa da Silva**,

Teresinha de Jesus Cardoso Farias Pereira, Kátia Silene Sousa Carvalho e Vladimir Costa Silva pelos risos e lanches. Gratidão a todos!

SILVA, Renata Vieira de Sousa. Perfil lipídico em indivíduos com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV. Dissertação (Mestrado em Ciências e Saúde) – Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, 2022.

RESUMO

Introdução: Muitos pacientes com leishmaniose visceral (LV), ou calazar, e HIV/AIDS apresentam refratariedade ao tratamento recomendado com anfotericina B. O objetivo deste estudo foi investigar se a razão para este fenômeno é a resistência do agente *Leishmania infantum* ao medicamento ou se isso se deve a fatores do paciente associados ao tratamento. **Métodos:** A susceptibilidade à anfotericina B foi avaliada *in vitro*, testando cinco isolados de *L. infantum* obtidos de indivíduos infectados com HIV e LV tratados com anfotericina B. O perfil lipídico de 29 indivíduos com LV e HIV/AIDS com e sem refratariedade ao tratamento com anfotericina B foi avaliado. **Resultados:** A suscetibilidade à anfotericina foi uniforme entre os cinco isolados testados e semelhante à cepa de referência. Os pacientes co-infectados apresentaram níveis normais de colesterol total e triglicérides, enquanto os níveis de HDL, LDL e VLDL estavam abaixo do valor de referência. Os níveis de VLDL, triglicérides e LDL eram mais baixos em pacientes LV recidivantes do que em pacientes LV não recidivantes e foram associados ao óbito ($p<0,004$) e ao diagnóstico anterior de LV ($p<0,047$), respectivamente. **Conclusões:** Não encontramos evidências de resistência à anfotericina B em isolados obtidos de pacientes com LV e HIV/AIDS em recidiva. Entretanto, os baixos níveis séricos de lipídios em pacientes com LV em recidiva abre a possibilidade de que baixos níveis de lipídios possam ter interferido na ação da droga e levado à refratariedade da anfotericina B em pacientes com LV e HIV/AIDS.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. *Leishmania infantum*. HIV coinfecção. Anfotericina B. Resistência a drogas. Metabolismo lipídico.

SILVA, Renata Vieira de Sousa. Lipid profile in individuals with visceral leishmaniasis coinfecting by HIV. Dissertação (Mestrado em Ciências e Saúde) – Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, 2022.

ABSTRACT

Introduction: Many patients with visceral leishmaniasis (VL), or kala-azar, and HIV/AIDS show refractoriness to the recommended treatment with amphotericin B. The aim of this study was to investigate whether the reason for this phenomenon is resistance of the agent *Leishmania infantum* to the drug or whether this is due to patient factors associated with treatment. **Methods:** Susceptibility to amphotericin B was assessed in vitro by testing five isolates of *L. infantum* obtained from HIV-infected and VL individuals treated with amphotericin B. The lipid profile of 29 individuals with VL and HIV/AIDS with and without refractoriness to amphotericin B treatment was evaluated. **Results:** Amphotericin susceptibility was uniform among the five isolates tested and similar to the reference strain. Co-infected patients had normal total cholesterol and triglyceride levels, while HDL, LDL and VLDL levels were below the reference value. VLDL, triglyceride and LDL levels were lower in relapsed VL patients than in non-relapsed VL patients and were associated with death ($p < 0,004$) and previous VL diagnosis ($p < 0,047$), respectively. **Conclusions:** We found no evidence of amphotericin B resistance in isolates obtained from relapsed VL and HIV/AIDS patients. However, the low serum lipid levels in relapsed VL patients opens the possibility that low lipid levels may have interfered with drug action and led to amphotericin B refractoriness in VL and HIV/AIDS patients.

Keywords: Visceral leishmaniasis. *Leishmania infantum*. HIV coinfection. Amphotericin B. Drug resistance. Lipid metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Indivíduo adulto e criança com leishmaniose visceral	18
Figura 2	Forma promastigota e amastigota de Leishmania	20
Figura 3	Ciclo biológico de Leishmania sp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado	21
Figura 4	Inseto vetor	22
Figura 5	Desenho da placa para realização do teste de sensibilidade ao fármaco	35
Figura 6	Valores referenciais para a determinação do perfil lipídico	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de casos e incidência* de leishmaniose visceral segundo países, Região das Américas, 2012-2019	17
Tabela 2	Valores de EC ₅₀ dos isolados de indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021	38
Tabela 3	Características dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021	38
Tabela 4	Características clínicas dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021	39
Tabela 5	Dados laboratoriais dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021	40
Tabela 6	Dados da contagem de TCD4 dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021	40
Tabela 7	Dados da carga viral dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021	41
Tabela 8	Dados laboratoriais dos 29 indivíduos com LV coinfectados pelo HIV segundo diagnóstico anterior de leishmaniose visceral – Teresina, Piauí, 2021	41
Tabela 9	Perfil lipídico dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021.	42
Tabela 10	Correlação dos níveis séricos de colesterol, triglicérides HDL, VLDL e LDL com a quantidade de doses de anfotericina B lipossomal administradas em indivíduos com LV coinfectados pelo HIV – Teresina, Piauí, 2021.	42
Tabela 11	Correlação dos níveis séricos de colesterol, HDL, triglicérides, LDL e VLDL com a quantidade de doses de anfotericina B lipossomal administradas em com LV coinfectados pelo HIV – Teresina, Piauí, 2021.	43
Tabela 12	Associação entre o perfil lipídico com o desfecho clínico dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV de acordo com o desfecho clínico – Teresina, Piauí, 2021	43
Tabela 13	Associação entre o perfil lipídico com o diagnóstico anterior de LV dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV de acordo com o desfecho clínico – Teresina, Piauí, 2021	44

Tabela 14 Análise multivariada do diagnóstico anterior de LV com o perfil lipídico dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV de acordo com o desfecho clínico – Teresina, Piauí, 2021 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CV	Carga viral
EC50	Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo
HDL	High Density Lipoproteins – Lipoproteínas de alta densidade
HIV	Human Immunodeficiency Virus – Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HIV/LV	Coinfecção HIV/LV
HGM-CoA redutase	3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase
IC50	Concentração inibitória
IDTNP	Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela
IDL	Intermediate Density Lipoproteins – Lipoproteínas de média densidade
IFN- γ	Interferon gama
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1 β	Interleucina 1 beta
LabLeish	Laboratório de pesquisa em leishmanioses
LC	Leishmaniose cutânea
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LDL	Low Density Lipoproteins – Lipoproteínas de baixa densidade
LM	Leishmaniose mucosa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LP	Lipoproteínas
LV	Leishmaniose visceral
mg	Miligramas
mm ³	Milímetro cúbico
MTT	Tetrazólio MTT 3-(4,5 - dimetiltiazol -2- il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
NNN	Neal, Novy, Nicolle – meio de cultura
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OPS	Organización Panamericana de la Salud
Qm	Quilomícrons
SDS	Dodecilsulfato
SisLeish	Sistema de Informação Regional de Leishmaniose
TARV	Terapia antirretroviral
TCD4 ⁺	Linfócito T auxiliar CD4 ⁺
TG	Triglicérides/Triglicérideos
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UDI	Usuários de Drogas Injetáveis
UFPI	Universidade Federal do Piauí
VLDL	Very Low Density Proteins – Lipoproteínas de muito baixa densidade
μ L	Micro litro
μ M	Micromol
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Leishmaniose visceral	18
2.1.1 Aspectos epidemiológicos.....	18
2.1.2 Manifestações clínicas na leishmaniose visceral.....	19
2.1.3 Agente Etiológico e Ciclo biológico da infecção	20
2.1.4 Vetor	22
2.1.5 Reservatórios	23
2.1.6 Recidivas na leishmaniose visceral	24
2.2 Coinfecção HIV-<i>Leishmania</i>	24
2.3 Tratamento	26
2.4 Lipídios, lipoproteínas e apolipoproteínas	26
2.5 Perfil lipídico nas infecções por parasitas intracelulares	28
2.5.1 Perfil lipídico no HIV/AIDS e na leishmaniose visceral	29
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo geral.....	32
4.2 Objetivos específicos	32
5 METODOLOGIA	33
5.1 Tipo de estudo	33
5.2 Local de estudo	33

5.3 População amostral	33
5.4 Critérios de inclusão	33
5.5 Critérios de exclusão	33
5.6 Considerações éticas	34
5.7 Levantamento de dados dos prontuários	34
5.8 Ensaio <i>in vitro</i>	35
5.9 Análise do perfil lipídico	37
5.10 Registro dos dados	37
5.11 Análise estatística	37
6 RESULTADOS	39
6.1 Avaliação do ensaio <i>in vitro</i>	39
6.2 Avaliação clínica e laboratorial	39
6.3 Perfil lipídico	43
6.4 Avaliação da correlação entre o perfil lipídico com a quantidade de doses de anfotericina B lipossomal 43	
6.5 Associação entre o perfil lipídico com o desfecho clínico e diagnóstico anterior de leishmaniose visceral 44	
7 DISCUSSÃO	46
8 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO CLÍNICO/AMBULATORIAL	64
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	67
ANEXO B – TERMO DE COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DOS DADOS	70
ANEXO C – PROTOCOLO DE DESCONGELAMENTO DE CEPAS	71

ANEXO D – PROCESSAMENTO E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS	73
---	----

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças de transmissão vetorial, zoonóticas e são consideradas um problema de saúde pública. Apresentam uma ampla distribuição global estando presente nos cinco continentes e a maioria dos casos ocorrem na África, Ásia e Américas (OPAS, 2019). As leishmanioses são causadas por parasitos intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* que são transmitidos aos mamíferos suscetíveis durante o repasto sanguíneo de insetos vetores, mais conhecidos como flebótomos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. (MURRAY et al., 2005; ORYAN, 2015). Estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas vivem em regiões que existe o risco de adquirir a infecção. Nas Américas está presente em 18 países, e podem se manifestar nas formas visceral, cutânea, mucocutânea, difusa e dérmica pós-calazar (DNDi, 2019).

A infecção humana é causada por mais de 20 espécies do complexo *Leishmania* spp. A leishmaniose cutânea (LC) é causada por duas espécies de *Leishmania*, incluindo *Leishmania major* e *Leishmania tropica* no mundo antigo, enquanto que a leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) são causadas por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* no novo mundo. A leishmaniose visceral (LV) geralmente é causada por *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* no velho e novo mundo, respectivamente (CDC, 2021). A leishmaniose dérmica pós-calazar é uma complicação não letal da LV que pode se desenvolver meses ou anos após a conclusão do tratamento da LV, causando desfiguração severa geralmente no rosto (DNDi, 2019).

A LV é uma doença sistêmica que atinge sobretudo crianças menores de cinco anos; podendo estar associada a desnutrição, condições imunossupressoras como HIV e outras comorbidades. Caracteriza-se por febre prolongada, hepatoesplenomegalia, palidez, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia e por pancitopenias. Trata-se de uma infecção que apresenta uma resposta inflamatória de fase aguda marcada por aumento de proteína C-reativa e dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, particularmente o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e interleucina 10 (IL-10) associadas à gravidade da doença (COSTA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2016).

Com o advento do HIV, a LV tornou-se importante doença oportunista de pacientes com HIV/AIDS, o que dificulta a resposta terapêutica e é a causa mais frequente de recaídas, especialmente em pacientes com CD4 <200 células/ μ L. Apenas alguns

ensaios clínicos foram conduzidos sobre a eficácia de algumas terapias para LV e HIV/AIDS, que em sua maioria, foram realizados na Europa (infecções causadas por *L. infantum*) e África Oriental (infecções por *L. donovani*) (MONGE-MAILLO & LÓPEZ-VÉLEZ, 2016; AKUFFO *et al.*, 2018).

Os indivíduos com LV e HIV/AIDS representam um desafio no manejo clínico: apresentam sintomas e maiores taxas de toxicidade de medicamentos, falha no tratamento, recidiva e mortalidade. A recidiva de LV é um novo episódio de LV que ocorre após uma cura inicial. Indivíduos com LV e HIV/AIDS não só estão em alto risco de recidiva, mas frequentemente apresentam múltiplas recidivas, que progressivamente se tornam menos responsivos ao tratamento, eventualmente causando a morte (DIRO *et al.*, 2014).

As múltiplas recidivas poderiam ser devidas a resistência do parasita aos fármacos utilizados, uma vez que, alguns indivíduos apresentam diversos episódios, recebem tratamento, mas não curam. Entretanto, fatores próprios do hospedeiro poderiam ser responsáveis por falha terapêutica, tais como a contagem de células CD4 antes do tratamento, sem necessariamente haver resistência às drogas (COTA *et al.*, 2013; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). Outra razão, seria o metabolismo lipídico, com níveis de colesterol e lipoproteínas muito reduzidos tanto em pacientes com LV (BERTOLI *et al.* 1982; MEBAZAA *et al.* 1984; BEKAERT *et al.* 1989; MALMENDIER *et al.* 1990; BEKAERT *et al.* 1992; LIBEROPOULOS *et al.*, 2002; LAL *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2010; AGOURIDIS *et al.*, 2012; GATTO *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2014) e com HIV (FERNADEZ-MIRANDA *et al.*, 1998; FESSEL *et al.*, 2002; RAMOS *et al.* 2004), uma vez que foi demonstrado que dieta rica em lipídios aumenta a ação de anfotericina B (WASAN *et al.*, 1998).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmaniose visceral

2.1.1 Aspectos epidemiológicos

A LV, também conhecida como calazar é uma doença infecciosa parasitária causada por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania*. Nas Américas, ela é endêmica em 13 países e no período de 2001-2019 foram registrados 65.934 casos novos, resultando em uma média de 3.470 casos por ano. Cerca de 97% (2.529) dos casos de 2019 foram reportados pelo Brasil e os demais casos na Argentina, Bolívia, Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Venezuela e Uruguai (OPAS, 2020; WHO, 2020).

Tabela 1. Número de casos e incidência* de leishmaniose visceral segundo países, Região das Américas, 2012-2019.

ANO	2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019	
LOCAL	Casos	Incid.	Casos	Incid.	Casos	Incid.	Casos	Incid.	Casos	Incid.	Casos	Incid.	Casos	Incid.	Casos	Incid.
AMÉRICAS	2892	4,26	3396	4,2	3624	5,06	3448	3,86	3354	4,44	4239	5,23	3562	4,80	2603	2,96
ARGENTINA	24	1,13	7	0,61	11	1,75		0,89	11	0,72	9	1,07	2	0,49	9	0,94
BOLÍVIA											0	0,0	0	0,0	1	1,54
BRASIL	2770	4,54	3253	4,35	3453	5,21	3289	4,09	3200	4,88	4114	5,23	3466	5,05	2529	3,08
COLÔMBIA	9	2,34	13	2,65	31	3,3	21	7,04	37	3,54	29	3,44	16	2,65	11	0,42
EL SALVADOR	-	-	1	2,74	-	-	-	-	-	-	2	4,4	3	1,16	0	0,0
GUATEMALA	-	-	1	2,58	-	-	2	1,89	2	2,2	2	5,63	4	2,64	1	0,0
HONDURAS	-	-	3	1,21	2	3,12	6	2,4	7	2,25	8	2,48	8	8,35	3	0,12
MÉXICO	4	0,57	4	0,59	-	-	1	4,58	-	-	1	5,36	0	0	1	0,04
PARAGUAI	76	2,47	107	3,85	118	4,06	92	3,01	64	2,42	34	2,1	19	1,47	22	0,85
URUGUAI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,75	3	0,12
VENEZUELA	9	1,28	7	0,58	9	1,55	37	1,24	33	1,03	40	1,33	43	1,64	23	0,88

*: taxa de incidência = número de casos para cada 100.000 habitantes.

Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados notificados pelos programas nacionais de leishmanioses/serviços de vigilância, 2020.

No Piauí, casos de LV são notificados desde 1934 (PENNA, 1934 apud COSTA; PEREIRA; ARAUJO, 1990). O estado está entre os dez estados com maior registro de casos. A urbanização do calazar no Brasil foi primeiramente notificada em Teresina, região Nordeste do Brasil, em 1981. Teresina, capital do estado, é um dos principais focos urbanos da doença no Brasil (COSTA; PEREIRA; ARAUJO, 1990).

O número de casos e a taxa de incidência continuam diminuindo na Região das Américas em consequência da redução de 27% dos casos no Brasil (937) no ano de 2019, assim como na Colômbia, Guatemala, Honduras e Venezuela. No entanto, países como Argentina, Paraguai e Uruguai apresentaram aumento no número de casos e a Bolívia

reportou um caso de LV ao SisLeish pela primeira vez, embora a transmissão autóctone já havia sido confirmada em anos anteriores (OPAS, 2021).

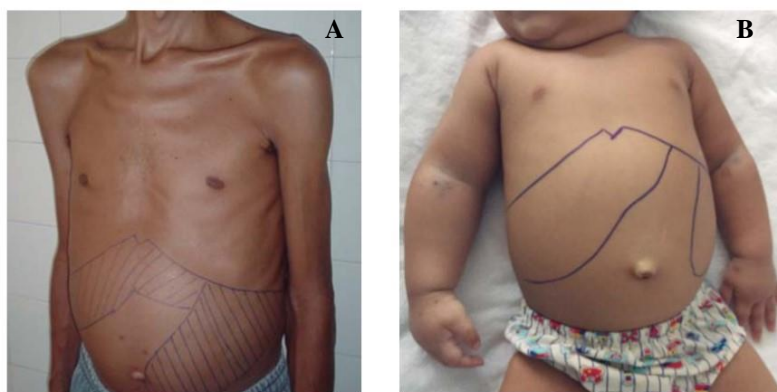
Apesar da redução de casos, a doença continua em expansão geográfica, principalmente nos países do Cone Sul, com destaque para o Uruguai, que registrou seu primeiro caso humano no final de 2018. Além disso, observou-se uma expansão em Honduras e El Salvador, onde requer uma detalhada investigação epidemiológica e entomológica para melhor caracterizar essas áreas de transmissão (OPAS, 2019).

2.1.2 Manifestações clínicas na leishmaniose visceral

A interação entre a *Leishmania* e a resposta imune do hospedeiro pode resultar em manifestações clínicas adversas. A LV caracteriza-se por febre irregular persistente, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia e pelas consequências das citopenias (MADALOSSO *et al.*, 2012; DOS SANTOS *et al.*, 2016).

No período inicial, ocorre febre, hepatoesplenomegalia discreta e palidez cutâneo-mucosa, podendo estar presentes tosse e diarreia (Figura 1) (MADALOSSO *et al.*, 2012).

Figura 1. Indivíduo adulto e criança com leishmaniose visceral



Fonte: Dorcas L. Costa, Universidade Federal do Piauí, Brasil.

A: indivíduo adulto com LV. Notar o emagrecimento e a hepatoesplenomegalia; **B:** criança com LV. Notar o aumento do volume abdominal devido à grande hepatoesplenomegalia.

Caso o diagnóstico não seja feito e o tratamento não seja instituído oportunamente, a doença evolui progressivamente para o “período de estado” com febre contínua, hepatoesplenomegalia discreta, piora da palidez e emagrecimento progressivo. O período final da doença associa-se com infecções bacterianas, desnutrição protéico-calórica, edema dos membros inferiores que pode evoluir para anasarca e outras manifestações importantes como hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), sendo as infecções

bacterianas responsáveis pela maioria dos óbitos (ANDRADE; CARVALHO; ROCHA, 1990; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010; MADALOSSO *et al.*, 2012; GATTO *et al.*, 2013).

Laboratorialmente, as citopenias são o marco hematológico da LV. A anemia é o achado mais frequente nos indivíduos sintomáticos. Podem participar de sua patogênese, ainda mecanismos imunes, a hemofagocitose, a carência nutricional de oligoelementos (ferro, folato, vitamina B12 e a hematopoiese ineficaz (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948; VARMA; NASEEM, 2010; MOKHTARI; KUMAR, 2013).

Na série branca, observam-se frequentemente leucopenia com neutropenia, ausência de eosinófilos e de basófilos, com linfocitose relativa, atribuídos ao provável hiperesplenismo. A plaquetopenia ocorre na evolução da doença pelo mesmo mecanismo de base da leucopenia, favorecendo os sangramentos. A pancitopenia sobrevém com o avançar da doença (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948; VARMA; NASEEM, 2010).

2.1.3 Agente Etiológico e Ciclo biológico da infecção

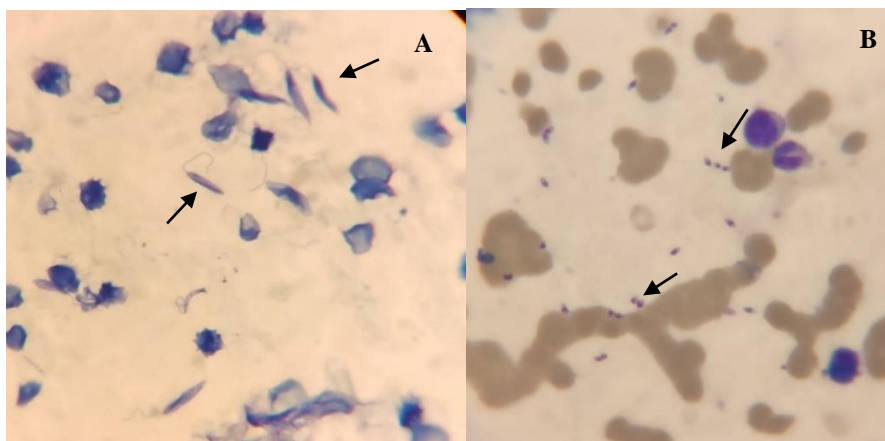
As leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas por parasitas protozoários flagelados da família *Trypanosomatidae* do gênero *Leishmania* que são transmitidos entre humanos ou outros hospedeiros mamíferos por flebotomíneos. Espécies distintas de *Leishmania* causam diferentes manifestações clínicas, variando em gravidade, desde lesões cutâneas autocuráveis até doenças viscerais com risco de vida. O resultado é determinado pela interação parasita-hospedeiro, destacando: características do parasita, biologia do vetor e fatores do hospedeiro, com respostas imunes ocupando o centro do palco entre os fatores do hospedeiro. A leishmaniose visceral – causada por *L. donovani* na Ásia e na África e *L. infantum* na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia central, América do Sul e América Central – é a forma sistêmica mais grave que geralmente é fatal, a menos que seja tratada (BURZA, 2018).

Três diferentes ciclos de transmissão foram caracterizados nas Américas: o selvagem, o doméstico-rural e o doméstico-urbano. No ciclo da selvagem, a infecção humana ocorre quando o homem entra na floresta ou na selva e é picada por vetores infectados. Nesse caso, o homem é um hospedeiro acidental que não interfere no ciclo de transmissão, e os reservatórios são animais da selva. Nos ciclos doméstico-rural e doméstico-urbano, os vetores atingem o peri-domicílio, entram nas residências e transmitem a infecção ao núcleo familiar, estudos mostram que o cão é o principal

reservatório na transmissão da leishmaniose visceral em ambientes urbanos (ciclo urbano-doméstico) (OPS, 2019).

O parasita exibe um ciclo de vida digenético, existindo como promastigotas flagelados no vetor, transformando-se em sua forma amastigota (Figura 2) mediante infecção em hospedeiros (mamífero susceptível), onde se desenvolve intracelularmente (NEVES, 2017).

Figura 2. Forma promastigota e amastigota de *Leishmania*

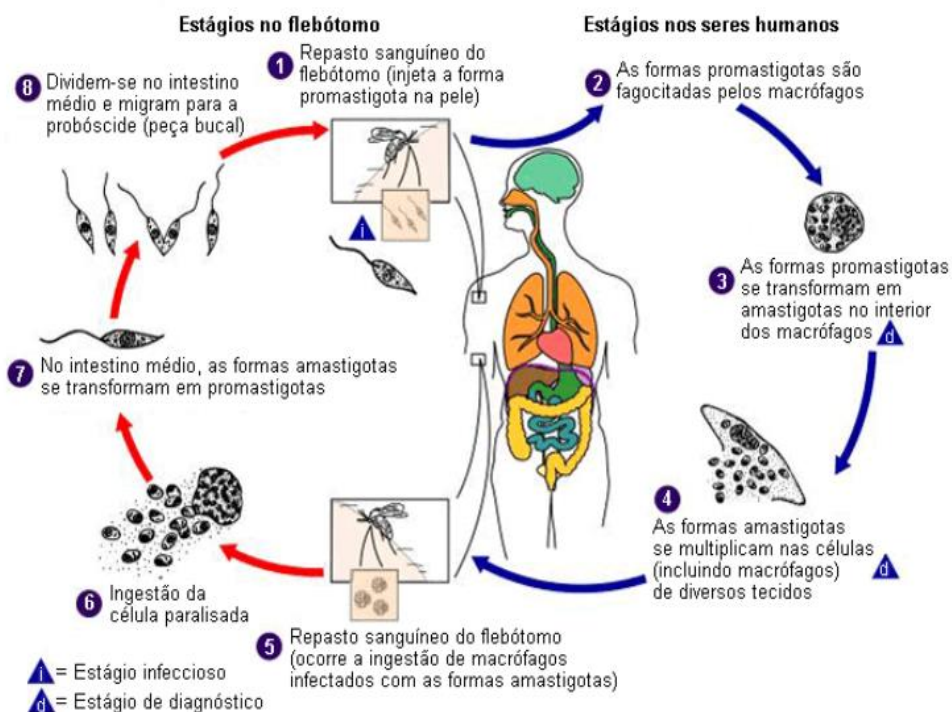


A: forma promastigota de *Leishmania*; **B:** forma amastigota de *Leishmania*
 Fonte: Emille Andrade Sousa. Laboratório de pesquisa em leishmanioses – LabLeish, 2019

A infecção no vetor ocorre quando as fêmeas, hematófagas, cumprindo necessidade biológica, alimentam-se em hospedeiro vertebrado infectado e ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas. No interior do intestino médio (estômago), rapidamente ocorre ruptura das células liberando as formas amastigotas que, após a divisão binária, transformam-se em promastigotas arredondadas e de flagelo curto, que se dividem intensamente, ou alongadas com um flagelo longo e cujo processo de divisão é bem menos intenso. Quando a matriz peritrófica se rompe, entre 47 a 72 horas após o repasto alimentar, as formas promastigotas livres migram para o intestino anterior. São observadas diferentes formas promastigotas no interior do inseto vetor que provavelmente tem papéis diferentes no estabelecimento e na manutenção da infecção. Nesta etapa do ciclo, uma das formas, a promastigota metacíclica permanece se reproduzindo por divisão binária. Ocorre migração para porção anterior do trato digestivo do inseto que ficará repleta de parasitos na forma promastigota metacíclica (forma infectante). A infecção ocorre após a regurgitação de promastigotas na pele durante o hematofagismo da fêmea do inseto vetor (flebotomo). Promastigotas são interiorizados em macrófagos, onde se desenvolvem em amastigotas e se multiplicam nos fagolisossomos. Posteriormente, os

parasitas podem disseminar-se e infectar células do sistema retículo-endotelial em vários tecidos, infiltrando predominantemente o baço, medula óssea, fígado e linfonodos (Figura 3) (NEVES, 2017).

Figura 3. Ciclo biológico de *Leishmania* sp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado



Fonte: CDC, 2017

2.1.4 Vetor

Os parasitas são transmitidos pela picada de um minúsculo inseto, o flebotomíneo (Figura 4). Existem cerca de 500 espécies conhecidas de flebotomíneos, mas apenas cerca de 30 foram encontradas para transmitir as leishmanioses. Os flebotomíneos estão inseridos na ordem Diptera, onde dois gêneros principais são responsáveis pela transmissão, *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*) (SILVA; MORGADO, 2019; WHO, 2020).



Fonte: OPS (Organización Panamericana de la Salud), 2019.

Os únicos vetores comprovados da LV humana são espécies e subespécies dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. A biologia de cada espécie de flebotomíneo é única e complexa e tem influência direta na epidemiologia da leishmaniose e no controle de vetores. A distribuição temporal e espacial dos flebotomíneos depende de fatores geográficos e climáticos locais (WHO, 2020).

No Brasil, duas espécies (*Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*), até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença. A primeira espécie é considerada a principal transmissora da *L. infantum* no Brasil e, recentemente, *Lu. cruzi* foi incriminada como vetor no estado de Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2019).

Ao final da década de 80, verificou-se a adaptação deste vetor aos ambientes urbanos, em periferias de grandes centros, principalmente na Região Sudeste, podendo ser encontrados no peridomicílio, em galinheiros, chiqueiro, canil, paiol, entre outros ambientes e também no intradomicílio. Há indícios de que o período de maior transmissão da LV ocorra durante e logo após a estação chuvosa, quando há um aumento da densidade populacional do inseto (BRASIL, 2019).

2.1.5 Reservatórios

Raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*), têm sido encontrados como reservatórios silvestres no Novo Mundo, embora outras espécies de canídeos silvestres, lagomorfos e roedores sejam (NEVES, 2017). No ambiente urbano, indivíduos, principalmente aqueles com HIV, e cães são fontes de infecção para o vetor. Devido à sua maior capacidade de infectar o vetor, pensa-se que o cão seja o principal reservatório urbano. Seus principais sintomas são:

emagrecimento, queda de pelo, crescimento e deformação das unhas, paralisia de membros posteriores, desnutrição, entre outros (FERREIRA *et al.*, 2018). Mais recentemente, o gato foi incluído como potencial reservatório do parasita no ambiente urbano, uma vez que foi demonstrado que gatos infectados por *L. infantum* são capazes de infectar o vetor biológico *Lu. Longipalpis* e transmitir a infecção para outro indivíduo não infectado (BATISTA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020).

2.1.6 Recidivas na leishmaniose visceral

A recidiva é o reaparecimento de uma doença ou sintoma após o fim do tratamento. Na LV, a cura é definida pelo desaparecimento de febre, citopenia e hepatoesplenomegalia. Um episódio de recidiva deve ser questionável em caso de ressurgimento de febre, piora da citopenia ou aumento de hepatoesplenomegalia em relação ao alcançado ao fim do tratamento medicamentoso (COTA *et al.*, 2017).

2.2 Coinfecção HIV-*Leishmania*

A associação das infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pelo protozoário *Leishmania* spp. caracteriza a coinfecção HIV/*Leishmania*. O primeiro caso de coinfecção HIV/*Leishmania* foi descrito em 1985, no sul da Europa (DE LA LOMA *et al.*, 1985). Esta coinfecção foi reportada por 42 países, sendo considerada doença emergente de alta gravidade em várias regiões do mundo. Tal situação é particularmente preocupante no sudoeste da Europa, no sul da Ásia, ao Sul do Saara e na América do Sul, em que o Brasil surge como um dos países que requer atenção devido ao grande número de casos das duas infecções (WHO, 2021).

Do ponto de vista epidemiológico, dois aspectos chamam a atenção, principalmente nos países da região do Mediterrâneo: a maior frequência de infecção por *Leishmania* spp. entre pacientes infectados pelo HIV, comparada à ocorrência na população geral, e o predomínio da infecção entre usuários de drogas injetáveis (UDI) (ALVAR *et al.*, 1997; CRUZ *et al.*, 2002).

As recentes alterações nos perfis epidemiológicos da AIDS e da LV no Brasil apontam para maior exposição da população às duas infecções, caracterizada pela interiorização da infecção pelo HIV simultânea à urbanização da LV, bem como o aumento do número de casos na faixa etária de 20 a 49 anos e a letalidade de aproximadamente 23,0% nos maiores de 50 anos (SOUSA-GOMES *et al.*, 2011).

A pandemia da AIDS tem modificado a história natural da LV. A infecção pelo HIV aumenta o risco de desenvolvimento da LV em áreas endêmicas, reduz a eficácia da resposta terapêutica e aumenta consideravelmente a probabilidade de recidivas. Ao mesmo tempo, a LV promove a progressão clínica da doença por HIV e o desenvolvimento do vírus. Ambas as doenças são condições definidoras, pois exercem um efeito sinérgico negativo sobre a resposta imune celular porque visam células imunes similares, como células dendríticas e macrófago (WOLDAY *et al.*, 1999; OLIVIER *et al.*, 2003; ALVAR *et al.*, 2008).

A infecção pelo vírus HIV tem modificado não apenas a epidemiologia, mas também os achados clínicos da LV, a qual é considerada doença oportunista nas situações de coexistência. Em geral, a apresentação da LV nos indivíduos com HIV é semelhante à dos indivíduos sem HIV (SAPORITO *et al.*, 2013). No entanto, quadros atípicos podem sobrevir, geralmente em pessoas com baixa contagem de linfócitos T CD4⁺, dificultando o diagnóstico e retardando, conseqüentemente, o tratamento. A presença de outras comorbidades e infecções oportunistas contribuem para o aumento da letalidade e a imunodepressão cumulativa na coinfeção HIV/LV pode acelerar a evolução de ambas as condições (LIMA *et al.*, 2013; LINDOSO *et al.*, 2014). A terapia antirretroviral (TARV) deve ser iniciada assim que o tratamento para LV for admitido (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

É notável que indivíduos com LV coinfectados pelo HIV apresentam maior número de recidivas com descrições de diversos fatores de maior risco para o surgimento de novos episódios da doença nesse grupo (FERNÁNDEZ-GUERRERO *et al.*, 2004; ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2017; SIMÃO; VICTÓRIA; FORTALEZA, 2020). As recidivas, quando ocorrem, tendem a se tornar progressivamente menos agudas, mais atípicas e menos responsivas ao tratamento. Mesmo quando em terapia antirretroviral (TARV) altamente ativa, foram relatadas taxas de recidiva de um ano de 30% a 60% (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Alguns indivíduos coinfectados tendem a melhorar após receber terapia antirretroviral (TARV), há melhora na imunidade, diminui o número de recaídas e a infecção torna-se controlada. Porém, uma parcela dos pacientes coinfectados apresenta falha terapêutica definitiva com infecção persistente e uma severa pancitopenia que leva a uma maior exposição a infecções oportunistas e hemotransfusões frequentes (RUSSO *et al.*, 2003; SOUSA-GOMES *et al.*; 2011).

A gravidade das manifestações clínicas, a resposta ao tratamento, a evolução e o prognóstico estão diretamente associados à condição imunológica do paciente, avaliada por meio da contagem de linfócitos TCD4⁺. São fatores relacionados à recidiva: contagem de CD4 inferior a 100 células/mm³ por ocasião do diagnóstico de LV; diagnóstico anterior de LV; recuperação insuficiente de CD4 após o tratamento de LV; e ausência de profilaxia secundária para LV (COTA; SOUSA; RABELLO, 2011).

2.3 Tratamento

Os medicamentos utilizados para o tratamento da LV são os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B (lipossomal e desoxicolato). Entretanto, a escolha do medicamento deve considerar as condições clínicas dos pacientes, a presença de coinfeções e gravidez.

A anfotericina B é um antibiótico de polieno que é administrado como desoxicolato intravenoso e desde 1997 em lipossomas. No entanto, o seu uso em regiões endêmicas mais pobres é limitado pelo seu alto custo. Em indivíduos coinfectados HIV/LV, o fármaco utilizado é a anfotericina B lipossomal. (PONTE-SUCRE; DIAZ; PADRÓN-NIEVES, 2013; GHORBANI; FARHOUDI, 2018; CAPELA; MOREIRA; LOPES, 2019). No entanto, mesmo seguindo o tratamento correto, é comum ocorrer nestes indivíduos pancitopenia grave, elevação da carga parasitária, baixa contagem de células CD4 (apesar da carga viral não ser detectada), resposta de tratamento precária, maior falha inicial e aumento no número de recidivas (ALVAR *et al.*, 1997; JHA *et al.*, 1999; SUNDAR *et al.*, 2002; BERMAN *et al.*, 2003; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

2.4 Lipídios, lipoproteínas e apolipoproteínas

Os lipídios biológicos são um grupo de compostos quimicamente diversos, cuja característica em comum que os define é a insolubilidade em água. As funções biológicas dos lipídios são tão diversas quanto a sua química. Gorduras e óleos são as principais formas de armazenamento de energia em muitos organismos. Os fosfolipídios e os esteróis são os principais elementos estruturais das membranas biológicas. Outros lipídeos, embora presentes em quantidades relativamente pequenas, desempenham papéis cruciais como transportadores de elétrons, pigmentos fotossensíveis, agentes emulsificantes no trato digestivo, hormônios e mensageiros intracelulares. São indispensáveis na dieta dos seres humanos, por incluírem os ácidos graxos essenciais e as vitaminas lipossolúveis (NELSON; COX, 2014; MARZZOCO; TORRES, 2017).

Os ácidos graxos podem ser classificados como saturados (sem duplas ligações entre seus átomos de carbono), mono ou poli-insaturados, de acordo com o número de ligações duplas em sua cadeia. Os triacilgliceróis (também denominados triglicérides ou triglicérides [TG]) são formados a partir de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e constituem uma das formas de armazenamento energético mais importantes no organismo sendo armazenado no tecido adiposo, de localização subcutânea e visceral. Os esteroides são lipídios que apresentam um núcleo tetracíclico característico em sua estrutura. O composto chave deste grupo é o colesterol, não apenas por ser o esteroide mais abundante dos tecidos animais, como por servir de precursor à síntese de todos os outros esteroides, que incluem hormônios esteroides (hormônios sexuais e do córtex das glândulas suprarrenais), sais biliares e vitamina D. O colesterol tem, ainda, uma função estrutural importante nas membranas de células animais (NELSON; COX, 2014; MARZZOCO; TORRES, 2017).

Nos seres humanos, os lipídios apolares associam-se a lipídios anfipáticos e proteínas, formando as lipoproteínas plasmáticas (LP). As lipoproteínas plasmáticas são partículas esféricas com um núcleo central de lipídios apolares, circundado por uma monocamada de lipídios anfipáticos, à qual estão associadas moléculas de proteínas. Estas proteínas são denominadas conjuntamente de apolipoproteínas e classificadas em A, B, C, D e E, cada classe contendo vários subtipos (MARZZOCO; TORRES, 2017).

As lipoproteínas plasmáticas são classificadas segundo a sua densidade, que é tanto menor quanto maior for o seu teor de lipídios. As principais classes de lipoproteínas são: quilomícrons, VLDL (very low density lipoproteins), IDL (intermediate density lipoproteins), LDL (low density lipoproteins) e HDL (high density lipoproteins). Os quilomícrons são sintetizados na mucosa intestinal a partir dos lipídios da dieta, que, desta forma, são transportados aos tecidos. A VLDL tem origem hepática e transportam triglicérides e colesterol para os outros tecidos; originam as IDL e as LDL, ricas em colesterol. As HDL têm função oposta à das LDL, atuando na remoção de colesterol dos tecidos (MARZZOCO; TORRES, 2017).

O colesterol do organismo humano pode ser obtido por produção endógena ou a partir dos alimentos. Os principais órgãos responsáveis pela produção de colesterol são o fígado e o intestino delgado. O colesterol, originário da síntese endógena ou dos alimentos, é transportado pelas lipoproteínas plasmáticas. Os quilomícrons são sintetizados a partir de gorduras da dieta no retículo endoplasmático dos enterócitos, células epiteliais que recobrem o intestino delgado. Os quilomícrons então se movem pelo

sistema linfático e entram na corrente sanguínea. As apolipoproteínas ativam a lipase lipoproteica nos capilares do tecido adiposo de vários órgãos permitindo a liberação de ácidos graxos livres para esses tecidos, portanto, os quilomícrons transportam ácidos graxos da dieta para os tecidos onde eles serão consumidos ou armazenados como fonte de energia. O que resta dos quilomícrons move-se pela corrente sanguínea para o fígado. Receptores existentes no fígado ligam a apolipoproteína E nos quilomícrons restantes e controlam sua captação por endocitose. No fígado, os remanescentes liberam seu colesterol e são degradados nos lisossomos; essa via do colesterol da alimentação até o fígado é a via exógena (NELSON; COX, 2014). Quando a dieta contém mais ácidos graxos e colesterol do que a quantidade necessária para uso imediato como combustível ou como precursores de outras moléculas, eles são convertidos em triglicérides no fígado e empacotados com apolipoproteínas específicas, formando VLDL. As VLDL são transportadas pelo sangue do fígado para o músculo e o tecido adiposo. A perda de triglicérides converte parte da VLDL em remanescentes VLDL (também chamadas de IDL). A remoção adicional de triglicérides da IDL (restantes) produz LDL. A LDL transporta colesterol para os tecidos extra-hepáticos, como músculo, glândulas suprarrenais e tecido adiposo. A LDL não captada pelos tecidos periféricos retornam ao fígado onde são captados via receptores de LDL na membrana plasmática dos hepatócitos. Essa via, da formação de VLDL no fígado ao retorno de LDL para o fígado é a via endógena do metabolismo e transporte do colesterol (NELSON; COX, 2014).

O HDL origina-se no fígado e no intestino delgado e possui a enzima lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT) que catalisa a formação de colesterol. A LCAT na superfície das partículas de HDL nascentes converte o colesterol dos quilomícrons restantes e da VLDL encontradas na corrente sanguínea, dando início a formação do núcleo da HDL, transformando a HDL nascente em forma de disco em uma partícula de HDL madura de forma esférica. A HDL nascente captura o colesterol das células extra-hepáticas ricas em colesterol e a HDL madura então retorna ao fígado, onde o colesterol é descarregado. Parte dos ésteres de colesterol no HDL pode ser transferida ao LDL pela proteína transportadora de éster de colesterol. O circuito do HDL é o transporte reverso do colesterol. Seu efeito final é antiaterogênico (NELSON; COX, 2014).

2.5 Perfil lipídico nas infecções por parasitas intracelulares

Muitas doenças infecciosas apresentam alterações séricas do perfil lipídico. Na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), os níveis de triglicérides estão elevados,

enquanto que, os de HDL estão reduzidos (FERNANDEZ-MIRANDA *et al.*, 1998; FESSEL *et al.*, 2002; RAMOS *et al.* 2004). Pacientes em áreas endêmicas e expostos à malária tem hipocolesterolemia como sinal desta infecção, assim como, tuberculose pulmonar, leishmaniose visceral, brucelose e infecções crônicas pelos vírus HCV e HBV (Hepatite C e Hepatite V, respectivamente) (MOUTZORI *et al.*, 2011).

Diversos estudos já demonstraram que o colesterol é crucial em interações entre parasitas e hospedeiros, seja na internalização, ligação entre receptores, fagocitose ou sobrevivência destes patógenos (GOLUSKO; NOWICKI, 2005; SONDA; HEHL, 2006). O colesterol é requerido para fagocitose da *Mycobacteria spp.*, *Escherichia coli*, *Brucella suis* e no caso de *Chlamydia trachomatis* e de *Listeria monocytogenes*. Já parasitas como *Toxoplasma gondii*, e *Plasmodium falciparum* dependem do colesterol da célula hospedeira para sua sobrevivência (BANSAL *et al.*, 2005).

2.5.1 Perfil lipídico no HIV/AIDS e na leishmaniose visceral

A LV e a AIDS são infecções que apresentam dislipidemias, sendo caracterizadas na maioria dos casos pela redução dos níveis de colesterol total, LDL e HDL, apolipoproteínas A e B; e por aumento dos níveis de triglicerídeos (BERTOLI *et al.* 1982; MEBAZAA *et al.* 1984; BEKAERT *et al.* 1989; MALMENDIER *et al.* 1990; BEKAERT *et al.* 1992; DURO *et al.*, 2013; DAVE *et al.*, 2016; JI *et al.*, 2019).

A prevalência de dislipidemia em indivíduos com HIV está associada a fatores dos hospedeiros, ao próprio HIV e ao tratamento com drogas antirretrovirais. A introdução da terapia antirretroviral para controlar a carga do HIV e melhorar o prognóstico dos indivíduos com HIV tem sido associada a desarranjos e anormalidades no metabolismo lipídico na distribuição de gordura. Dave *et al* (2016) observaram que indivíduos em uso de TARV apresentaram níveis mais elevados de triglicerídeos, colesterol total, LDL e HDL do que aqueles que não tinham recebido TARV. Em um estudo de coorte retrospectivo foi observado que indivíduos submetidos a TARV, após três anos de tratamento apresentaram dislipidemia por aumento nos níveis de triglicerídeos, colesterol total e LDL, e aumento de 46% nos níveis de HDL (DURO *et al.*, 2013).

Os dados na literatura sobre distúrbios no perfil lipídico em indivíduos com LV vem sendo apresentados em relatos de casos e em pequenas populações de estudo. Desde a década de 80 já se relatara tais alterações (BERTOLI *et al.*, 1982). Em casos clínicos

reportados de LV foi observada hipocolesterolemia, hipertrigliceridemia e redução de HDL e LDL (AGOURIDIS *et al.*, 2012; LIBEROPOULOS *et al.*, 2002; LAL *et al.*, 2007). Ottoni (2010) constatou redução de HDL e colesterol total com tendência de aumento de triglicérides em 32 indivíduos com LV. Soares *et al* (2010), compararam 26 pacientes com LV e 26 controles, nos quais, os indivíduos com LV apresentaram níveis elevados de triglicérides e VLDL, e uma redução dos níveis de colesterol total, LDL, HDL e apoliproteína A, e limitada redução de apoliproteína B.

No estudo desenvolvido por Berkaert *et al.* (1989) em 17 crianças com LV, ocorreu hipertrigliceridemia e redução de HDL. Noutros dois casos em crianças com LV, as concentrações de HDL antes do tratamento foram mais baixas, enquanto os níveis de triglicérides estavam aumentados (SEÇMEER *et al.*, 2006). Gatto *et al.* (2013) avaliaram 13 indivíduos com LV (pré e pós tratamento) e os comparou com 16 controles, e observou que os indivíduos com LV ativa apresentaram níveis menores de colesterol total, HDL, LDL e níveis maiores de triglicérides em relação aos indivíduos pós-tratamento e aos controles. O tratamento aumentou os níveis de albumina e lipoproteínas e diminuiu os níveis de triglicérides. Carvalho *et al.* (2014) avaliaram o perfil lipídico de 81 indivíduos, nos quais, revelaram níveis elevados de triglicérides e níveis elevados de VLDL em todos os indivíduos sintomáticos infectados com LV em comparação com os indivíduos infectados assintomáticos e não infectados.

As alterações dos níveis de lipoproteínas podem ser consequência do processo infeccioso e que os lipídios podem favorecer a progressão em infecções. Na membrana plasmática há “lipid rafts” que são microdomínios ricos em colesterol ou esfingolipídios com funções de transporte, transdução de sinal, endocitose e porta de entrada a patógenos (CHAKRABORTY *et al.*, 2005; DANTAS, 2013). Pucadyl *et al.* (2004) demonstraram que a depleção de colesterol da membrana plasmática com metil- β -ciclodextrina (M β CD) reduzia significativamente a infecção de macrófagos *in vitro* pela *Leishmania donovani*.

3 JUSTIFICATIVA

A coinfeção HIV/LV dificulta a resposta terapêutica sendo a causa mais frequente de recidivas, especialmente em indivíduos com CD4 <200 células/ μ L. Apenas alguns ensaios clínicos foram conduzidos sobre a eficácia de algumas terapias para a coinfeção HIV/LV, e a maioria foram realizados na Europa (infecções causadas por *L. infantum*) e África Oriental.

Em um estudo feito em coelhos por Wasan *et al.* (1998), foi avaliada a toxicidade renal por uso de anfotericina B desoxicolato e lipossomal. Foi observado que em coelhos que foram induzidos a uma dieta rica em colesterol notou-se diferenças significativas na farmacocinética, lipoproteína sérica e distribuições em tecidos, e toxicidades renais induzidas por anfotericina B desoxicolato mas não por anfotericina B lipossomal. Pressupõe-se que mudanças no perfil lipídico que ocorrem em indivíduos com níveis séricos anormais de lipídios alteram a distribuição de anfotericina B. Além disso, tem sido sugerido que a farmacocinética da anfotericina B pode ser um resultado da lenta liberação da droga de um tecido ou local de um órgão, devido à afinidade da anfotericina B em se ligar ao colesterol, lipoproteínas séricas ou membranas celulares.

Este estudo foi concebido para entender a razão das sucessivas recidivas de LV em indivíduos com HIV submetidos ao tratamento inicial e profilaxia secundária com anfotericina B. Inicialmente, foram feitos testes *in vitro* de sensibilidade à anfotericina B de alguns isolados obtidos de indivíduos com LV e HIV/AIDS recidivante. Em seguida, foi realizado o perfil lipídico de indivíduos com HIV/AIDS com LV recidivante e de outros com o primeiro episódio de LV.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Investigar a causa de refratariedade ao tratamento com anfotericina B de indivíduos coinfectados com *L.infantum* e HIV.

4.2 Objetivos específicos

- Verificar a ocorrência de resistência *in vitro* à anfotericina B em isolados de *L. infantum* obtidos de indivíduos com HIV e LV refratária ao tratamento;
- Avaliar o perfil lipídico de indivíduos coinfectados HIV/leishmaniose visceral tratados com anfotericina B liposomal;
- Verificar a associação de refratariedade ao tratamento com anfotericina com o perfil lipídico.

5 METODOLOGIA

5.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo analítico e retrospectivo, considerando dados coletados a partir dos prontuários dos indivíduos internados no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (IDTNP), situado em Teresina – PI, com diagnóstico de LV coinfectados pelo HIV.

5.2 Local de estudo

Teresina é um município brasileiro, capital do Estado do Piauí e a única capital da Região Nordeste que não se localiza no litoral. Com uma população estimada em 871.126 habitantes em 2021, é a cidade mais populosa do Piauí (IBGE, 2021).

O Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela é a referência no sistema público de saúde estadual para o diagnóstico e tratamento das doenças de natureza infecciosa e parasitária em todas as faixas etárias, oferecendo cuidado multiprofissional de média complexidade com demanda referenciada de emergência, internação e ambulatórios.

5.3 População amostral

Foram admitidos indivíduos com sorologia positiva para HIV, com diagnóstico de leishmaniose visceral (presença de *Leishmania infantum*) confirmado por método parasitológico (aspirado de medula óssea ou cultura) atendidos no hospital de referência estadual.

5.4 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo, os indivíduos de ambos os sexos e maiores de 18 anos que possuíam sorologia positiva para HIV com diagnóstico confirmado para LV por método parasitológico (pesquisa de amastigota na medula óssea ou cultura de promastigotas) com amostra de soro ou plasma disponíveis no laboratório de pesquisa em leishmanioses (LabLeish).

5.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo, os indivíduos que apresentaram valores negativos após a aplicação da fórmula de Friedewald para obtenção de valores do perfil lipídico.

5.6 Considerações éticas

Este estudo faz parte de um projeto central intitulado “Avaliação *in vitro* da susceptibilidade de isolados de *L. infantum* à anfotericina b e caracterização molecular de marcadores de resistência” e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFPI com o número de parecer 3.276.499 (ANEXO A). O estudo foi conduzido em conformidade com os preceitos fundamentais da resolução do Conselho Nacional de Saúde – CNS 466/12 que trata das diretrizes e normas de pesquisa envolvendo seres humanos. Não houve requerimentos de intervenções ou abordagens ao indivíduo (dispensa do uso de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) (ANEXO B), representando riscos mínimos (perda do sigilo) aos participantes, pois o mesmo foi desenvolvido com o uso de amostras disponíveis no laboratório e dados de prontuário. Os prontuários foram criteriosamente revistos para o levantamento e registro das informações requeridas, mantendo-se sempre a garantia de sigilo.

5.7 Levantamento de dados dos prontuários

O levantamento foi feito a partir dos registros de serviço de internação e serviço ambulatorial do IDTNP no período de maio de 2018 a agosto de 2020.

Variáveis de natureza epidemiológica, clínica e laboratorial foram coletadas em um instrumento padronizado estruturado elaborado especificamente para este fim (apêndice A). Para este estudo, foram considerados todos os dados referentes ao período integral no qual o paciente esteve no nosocômio.

Os dados foram coletados em questionário próprio que contemplava informações sobre sexo, idade e município; data de diagnóstico pelo HIV (se possível); presença ou ausência dos sinais e sintomas a seguir: astenia/fraqueza, perda de peso, hiporexia/recusa alimentar, palidez cutaneomucosa, tosse, dispneia, febre, diarreia, náuseas/vômitos, hepatomegalia, esplenomegalia, presença de edema; dados laboratoriais como contagens de linfócitos T CD4+, hemograma completo, ureia, creatinina, proteínas totais e frações; exames realizados para o diagnóstico de leishmaniose visceral quando disponíveis: parasitológico (aspirado de medula óssea e/ou cultura), biópsias e/ou cultura de tecido; foram considerados, ainda, registros de ultrassons, radiografias, tomografias computadorizadas e eletrocardiografia (apêndice A).

5.8 Ensaio *in vitro*

Os cinco isolados foram obtidos de indivíduos com LV coinfectados pelo HIV admitidos no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela. Estes isolados, encontravam-se criopreservados em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (IDTNP), em Teresina – PI. Todos os isolados foram provenientes de um segundo episódio de leishmaniose visceral dos indivíduos.

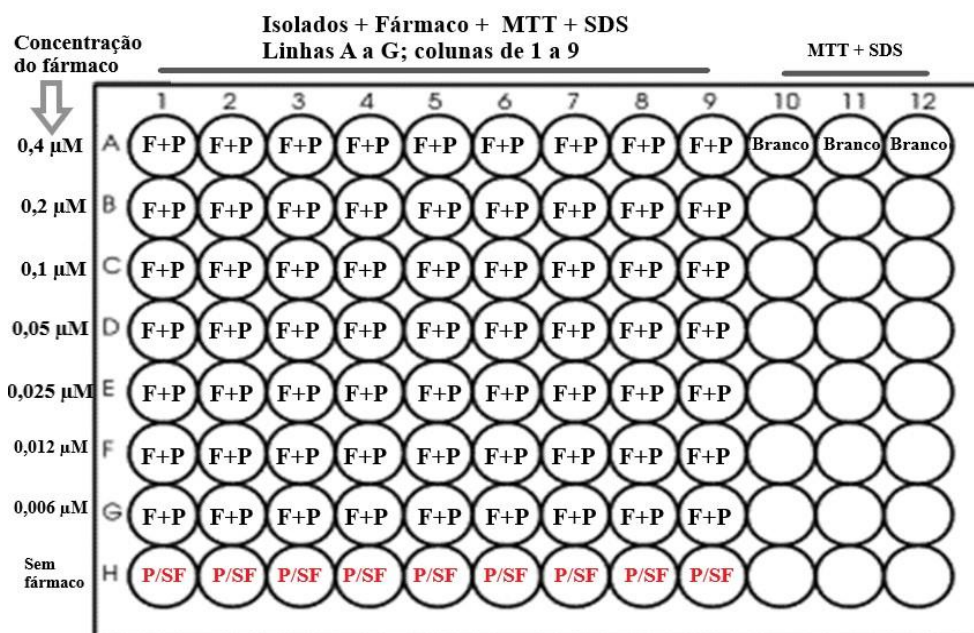
O descongelamento dos isolados seguiu o procedimento operacional padrão de descongelamento de amostras retiradas do criobanco (ANEXO C). As promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas primeiramente em meio NNN (Neal, Novy, Nicolle) com adição de 1 mL de meio Schneider's suplementado com 50 mL de soro fetal bovino e estéril inativado pelo calor (Gibco®), 1 mL de penicilina, 10 mL de urina humana masculina a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, uma alíquota de 100-200 μL era retirada deste meio e colocada em 5 mL meio Schneider's suplementado com 50 mL de soro fetal bovino e estéril inativado pelo calor (Gibco®), 1 mL de penicilina, 10 mL de urina humana masculina e 80 mg de gentamicina (Sigma, EUA), pH 7.0. As culturas foram mantidas em estufa a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ e os repiques foram feitos semanalmente.

Para o ensaio *in vitro* à anfotericina B foi utilizado o meio M199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, suplementado com 10% de soro fetal de bezerro inativado pelo calor (FCS) e 0,25% de hemina. A anfotericina B (já veio preparada para uso) e o MTT (Brometo de tetrazólio 3- (4,5-dimetil tiazol-2-il) – 2,5 difenil tetrazólio) foram adquiridos na companhia Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Uma solução estoque da anfotericina B foi preparada a 2 mM (cálculo de diluições de concentrações específicas, de acordo com a fórmula $(C1.V1 = C2.V2)$). O MTT é comercializado em forma de pó e foi diluído em solução tampão PBS (fosfato salino tamponado) na proporção de 5mg/mL e mantido refrigerado fora do alcance de luz.

O ensaio *in vitro* foi realizado conforme Zauli-Nascimento et al., 2010. Numa placa de 96 poços, foram adicionados 200 μL de meio aos poços da primeira linha e aos que correspondem ao “branco”; nos poços restantes 100 μL de meio. A primeira linha recebeu a maior concentração de anfotericina B (0.4 μM , 0.2 μM , 0.1 μM , 0.05 μM , 0.025, 0.012 μM e 0.006 μM). Em seguida foi homogeneizado e transferiu-se 100 μL do primeiro poço à linha imediatamente abaixo; a diluição ocorreu até a penúltima linha, os

últimos 100 µl foram desprezados. A última linha foi destinada somente para os parasitas, sem adição de droga (Figura 5).

Figura 5. Desenho da placa para realização do teste de sensibilidade ao fármaco



Legenda: F+P: fármaco (anfotericina B) + parasita (leishmania); Branco: somente MTT e SDS; sem parasita (leishmania); P/SF: parasita (leishmania) sem fármaco (anfotericina B).

Promastigotas em fase logarítmica foram coletados por centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos e ressuspensos em meio M199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal inativado de bezerro pelo calor (FCS) e 0,25% de hemina para concentração de 2×10^6 /mL. Após a diluição seriada do fármaco, foram adicionados 100 µL de parasita nos poços, exceto aos que correspondem ao ‘branco’. Posteriormente, a placa foi incubada a 25 °C em uma BOD por 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 30 µL de MTT 5mg/mL e novamente incubadas a 25 °C por 2 horas. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de SDS (dodecilsulfato de sódio) a 20% a cada poço. A leitura da absorbância foi feita em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm e usou-se como referência 690 nm. A cepa de referência de *L. infantum* (MHOM/BR/2005/NLC) foi utilizada como controle em todos os experimentos.

5.9 Análise do perfil lipídico

Foram incluídos 29 indivíduos para a análise do perfil lipídico. Somente um indivíduo teve o seu isolado e a sua amostra avaliados. As dosagens das frações lipídicas foram realizadas no laboratório do IDTNP. As amostras de soro ou plasma (ANEXO D) encontravam-se armazenadas em freezer -20 °C no LabLeish e foram processadas no equipamento Incca Bit Analisa (Belo Horizonte, Brasil). Para isto empregou-se o kit reagente Analisa (Belo Horizonte, Brasil) para colesterol total, triglicérides e HDL direto. Os valores de LDL e lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) foram obtidos a partir da fórmula de Friedewald ($VLDL=T/5$; $LDL=CT-HDL-VLDL$).

Os valores referenciais utilizados foram de acordo com o Consenso Brasileiro para a Normatização da Determinação Laboratorial do Perfil Lipídico (Figura 6).

Figura 6. Valores referenciais para a determinação do perfil lipídico

Tabela I. Valores referenciais e de alvo terapêutico conforme avaliação de risco cardiovascular estimado pelo médico solicitante do perfil lipídico para adultos >20 anos.

Lípides	Com jejum (mg/dL)	Sem jejum (mg/dL)	Categoria referencial
Colesterol Total*	< 190	< 190	Desejável
HDL-C	> 40	> 40	Desejável
Triglicérides**	< 150	< 175	Desejável
Categoria de risco			
LDL-C	< 130	< 130	Baixo
	< 100	< 100	Intermediário
	< 70	< 70	Alto
	< 50	< 50	Muito alto
Não-HDL-C	< 160	< 160	Baixo
	< 130	< 130	Intermediário
	< 100	< 100	Alto
	< 80	< 80	Muito alto

* CT > 310 mg/dL há probabilidade de HF.

** Quando os níveis de triglicérides estiverem acima de 440 mg/dL (sem jejum) o médico solicitante fará outra prescrição para a avaliação de TG com jejum de 12 h e será considerado um novo exame de triglicérides pelo laboratório clínico.

Fonte: Consenso Brasileiro para a Normatização da Determinação Laboratorial do Perfil Lipídico, 2016.

5.10 Registro dos dados

Todos os dados colhidos em prontuários foram devidamente registrados em planilha própria utilizando o software Excel®.

5.11 Análise estatística

Os valores de EC_{50} (concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo) no ensaio em promastigotas foram expressos como média e erro (SEM) gerados pelo programa GraphPad Prism 7.04.

Para análise dos dados foram utilizados os procedimentos usuais da estatística descritiva, tais como distribuição de frequência absoluta (n) e relativa (%), média, desvio padrão e mediana, além dos intervalos de confiança (IC_{95%}). Foi utilizado o teste Shapiro-Wilk para verificar se os dados seguem distribuição Normal.

Para comparar as médias foi usado o teste t de Student e o teste não-paramétrico U de Mann-Whitney para duas amostras. Para verificar a relação dos níveis séricos de colesterol, HDL, triglicérides, LDL e VLDL com a quantidade de doses de anfotericina B lipossomal foi usado a correlação de Pearson e a de Spearman.

Na análise bivariada das classificações do perfil lipídico com o diagnóstico anterior de leishmaniose visceral foi usado o teste Exato de Fisher. Em seguida foi aplicada estatística multivariada *odds ratio* (OR) da Regressão Logística Binária. Os dados foram tabulados e analisados no *IBM Statistical Package for the Social Sciences* versão 20.0. O nível de significância foi 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação do ensaio *in vitro*

A sensibilidade de cinco isolados procedentes de indivíduos com LV coinfectados pelo HIV à anfotericina B foi avaliada por meio do teste MTT e os valores obtidos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de EC₅₀ dos isolados de *L. infantum* de indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021.

Isolados	Anfotericina B (µM)			
	Média EC ₅₀	Erro padrão	Nº de experimentos	Nº de episódios de leishmaniose visceral
5567	0,042	0,007	5	2
5768	0,037	0,006	5	2
6905	0,034	0,007	4	2
5609	0,026	0,006	4	2
7055	0,024	0,008	5	2
MHOM/BR/2005/NLC*	0,051	0,005	3	-

*: cepa utilizada como controle

Fonte: Próprio autor, 2020.

O isolado 5567 obteve o maior valor de EC₅₀, mostrou ser menos sensível ao fármaco quando comparado aos outros isolados, enquanto o isolado 7055 apresentou maior sensibilidade à anfotericina B.

6.2 Avaliação clínica e laboratorial

A Tabela 3 mostra as características dos 29 participantes estudados, em que 89,7% são do sexo masculino e 58,6% apresentaram idade superior a 40 anos, sendo 23 (79,3%) indivíduos com mais de um episódio de leishmaniose visceral (recidivante) e seis (20,7%) indivíduos no primeiro episódio de leishmaniose visceral (não recidivante).

Tabela 3. Características dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021.

Variáveis	N=29	%	IC _{95%}
Sexo			
Masculino	26	89,7	71,5 – 97,3
Feminino	3	10,3	2,7 – 28,5
Idade			
Até 40 anos	12	41,4	24,8 – 59,5
Mais de 40 anos	17	58,6	40,5 – 75,2
Episódio de LV			
Recidivante	23	79,3	
Não recidivante	6	20,7	

N: número de indivíduos; %: percentual correspondente da amostra; IC_{95%} = Intervalo com 95% de confiança.

Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, 2021.

Todos os indivíduos eram coinfectados por HIV/*Leishmania*. Quatro indivíduos (13,8%) vieram a óbito. A pesquisa de parasitos em extensão de medula óssea por meio da microscopia foi positiva em todos os indivíduos e a cultura para *Leishmania* foi positiva em 7/29 participantes. Todos os indivíduos foram diagnosticados pelo método parasitológico (pesquisa direta ou cultura). O tempo de doença foi observado em 15 indivíduos (51,7%).

O tratamento para LV foi realizado com anfotericina B lipossomal em todos os participantes, contudo dois indivíduos foram tratados anteriormente com anfotericina B desoxicolato em episódios anteriores de LV. A adesão a TARV (terapia antirretroviral) foi observada em 22/29 (75,9%) dos indivíduos e sete indivíduos (7/29) (24,1%) mostraram uma má adesão à TARV. Considerou-se má adesão à TARV aqueles indivíduos que interrompem o tratamento.

Dentre as manifestações clínicas observadas na admissão, as mais frequentes foram perda de peso, palidez, febre, esplenomegalia e hepatomegalia. Outros parâmetros como icterícia, apatia, vômito, diarreia e dispneia também foram notados (**Tabela 4**).

Tabela 4. Características clínicas dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021.

Variáveis	N*	%	IC _{95%}
Tempo de doença LV**			
Até 30 dias	10	66,7	38,7 – 87,0
Mais de 30 dias	5	33,3	12,9 – 61,3
Sinais e sintomas			
Perda de peso	23	79,3	59,7 – 91,3
Palidez	23	79,3	59,7 – 91,7
Febre	18	62,1	42,4 – 78,7
Astenia/fraqueza	18	66,7	46,0 – 82,7
Esplenomegalia	16	55,2	35,9 – 73,0
Hepatomegalia	11	39,3	22,1 – 59,3
Icterícia	10	37,0	20,1 – 57,5
Apatia	9	33,3	17,2 – 53,9
Vômito	9	31,0	15,9 – 50,9
Diarreia	6	20,7	8,7 – 40,3
Dispneia	6	20,7	8,7 – 40,3

N: número de indivíduos; *: Alguns participantes não tinham a informação; **: Refere-se ao episódio atual da doença; %: percentual correspondente da amostra; IC_{95%} = Intervalo com 95% de confiança.

Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, 2021.

Na Tabela 5 podem ser observados os principais dados laboratoriais dos participantes que compõem o estudo. As alterações laboratoriais mais frequentes foram

anemia e leucopenia. Dentre os 29 participantes, 23 (95,8%) apresentaram níveis de hemoglobina abaixo do limite de normalidade e destes, oito (33,3%) apresentaram hemoglobina abaixo de 7 mg/dL, o que configura anemia grave. A contagem de leucócitos estava abaixo do limite de normalidade em 20 (74,1%) dos participantes. A contagem de neutrófilos estava abaixo de 1000 células/mL em nove (33,3%) indivíduos e estava abaixo de 500 células/mL em dois (7,5%) indivíduos, o que configura neutropenia grave. A contagem de plaquetas estava abaixo do limite de normalidade em 12 (44,5%) indivíduos.

Tabela 5. Dados laboratoriais dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021.

Variáveis	N*	Média	IC _{95%}
Hemoglobina (g/dL)	24	7,9	7,1 – 8,6
Leucócitos (mm ³)	27	2.896,1	2.022,4 – 3.769,9
Neutrófilos (mm ³)	24	56,3	48,9 – 63,6
Plaquetas (mm ³)	27	160.455,6	129.685,9 – 191.225,2
Transaminase oxalacética (U/mL)	15	35,3	26,5 – 44,1
Transaminase pirúvica (U/mL)	13	27,1	18,7 – 35,4
Creatinina (mg/dL)	22	5,3	0,0 – 11,8
Ureia (mg/dL)	21	32,2	24,2 – 40,2
Albumina (g/dL)	11	2,7	1,9 – 3,5
Globulina (g/dL)	10	6,4	5,0 – 7,7
Bilirrubina direta (mg/dL)	6	0,3	0,2 – 0,5
Bilirrubina indireta (mg/dL)	6	0,5	0,1 – 0,8
Contagem de linfócitos TCD4 (células/ μ L)	28	97,0	52,9 – 141,1
Carga viral de HIV-1 (cópias/mL)	27	1.722,0**	< 50 – 192.591,0

N: número de indivíduos; *: Alguns participantes não tinham a informação; **: Mediana e Intervalo dos quartis; IC_{95%} = Intervalo com 95% de confiança.

Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, 2021.

A contagem de linfócitos CD4 estava abaixo de 200 células/ μ L em 14 (50%) participantes (Tabela 6). Com relação a carga viral (CV) 20 indivíduos apresentaram valores entre o valor mínimo e o valor máximo (74,07%), em três indivíduos (11,1%) a CV foi abaixo do valor mínimo (40 cópias/mL), em quatro indivíduos (14,81%) não possível detectar o valor da CV e dois indivíduos não possuem dados a respeito desta variável (Tabela 7).

Tabela 6. Dados da contagem de TCD4 dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021.

Variável	Indetectável	<100	100 a 200	200 a 350	350 a 500	> 500	Sem dados
Linfócitos TCD4 (células/ μ L)	N= 10	N= 6	N= 8	N= 1	N= 2	N=0	N=1

N: número de indivíduos.

Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, 2021.

Tabela 7. Dados da carga viral dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021.

Variável	Não detectado	Igual ao L. mínimo	< L. mínimo	> L. superior	Entre L. mínimo e L. máximo	Sem dados
Carga Viral (cópias/mL)	N= 4	N= 0	N= 3	N= 0	N= 20	N= 2

N: número de indivíduos. L.mínimo= 40 cópias/mL, L.máximo= 10.000.000 cópia/mL.

Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, 2021.

Os dados laboratoriais dos indivíduos do estudo constam na tabela 8. Observou-se que houve diferença significativa em relação aos níveis de globulina quanto ao diagnóstico anterior de leishmaniose visceral entre os dois grupos ($p < 0,043$). Constatou-se que 6/10 participantes apresentaram valores de globulina acima do valor de referência (3,5 a 5,5 g/dL). Não foi possível verificar os valores dos outros participantes devido à ausência do exame no prontuário. Em relação às outras variáveis (hemoglobina, leucócitos, neutrófilos, plaquetas, transaminase oxalacética e pirúvica, creatinina, ureia, albumina, bilirrubina direta e indireta e contagem de linfócitos CD4) não foram observadas associações estatisticamente significativas.

Tabela 8. Dados laboratoriais dos 29 indivíduos com LV coinfectados pelo HIV segundo diagnóstico anterior de leishmaniose visceral – Teresina, Piauí, 2021.

Variáveis	Diagnóstico de LV				p-valor
	Recidivante (N=23)		Não recidivante (N=6)		
	N*	Média (IC _{95%})	N*	Média (IC _{95%})	
Hemoglobina (g/dL)	19	8,0 (3,6 – 12,5)	5	7,8 (7,2 – 8,4)	0,546 ^b
Leucócitos (mm ³)	21	4.642,7 (1.060,4 – 8.224,9)	6	2.397,1 (1.713,9 – 3.080,3)	0,062 ^b
Neutrófilos (mm ³)	19	50,2 (33,9 – 66,5)	5	57,8 (48,9 – 66,7)	0,396 ^a
Plaquetas (mm ³)	21	190.216,7 (89.298,0 – 291.135,3)	6	151.952,4 (151.952,3 – 184.813,4)	0,297 ^a
Transaminase oxalacética (U/mL)	12	29,0 (0,0 – 71,4)	3	36,9 (26,7 – 47,0)	0,462 ^a
Transaminase pirúvica (U/mL)	12	26,4 (17,4 – 35,4)	1	35,0	0,574 ^a
Creatinina (mg/dL)	18	22,9 (0,0 – 73,3)	4	1,3 (0,7 – 2,0)	0,185 ^b
Ureia (mg/dL)	18	20,0 (0,0 – 95,3)	3	34,2 (26,7 – 41,7)	0,203 ^a
Albumina (g/dL)	10	2,7 (1,9 – 3,6)	1	1,8	0,456 ^a
Globulina (g/dL)	9	6,0 (4,8 – 7,2)	1	9,9	0,043^a
Bilirrubina direta (mg/dL)	5	0,3 (0,1 – 0,5)	1	0,3	1,000 ^a
Bilirrubina indireta (mg/dL)	5	0,5 (0,1 – 0,9)	1	0,2	0,446 ^a
Contagem de linfócitos TCD4 (células/ μ L)	22	123,3 (0,0 – 279,9)	6	89,8 (43,1 – 136,5)	0,688 ^b

N: número de indivíduos; *: Alguns participantes não tinham a informação; ^at de Student; ^bMann-Whitney

Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, 2021.

6.3 Perfil lipídico

Para o colesterol total, todos os participantes apresentaram valores abaixo de 190 mg/dL. Acerca do valor de triglicérides, todos os indivíduos mostraram valores abaixo do desejável. Em relação aos valores de HDL, 20 (68,9%) participantes apresentaram valores abaixo de 40 mg/dL. Para o VLDL e LDL, todos os indivíduos apresentaram níveis de VLDL e LDL muito abaixo do desejável (Tabela 9).

Tabela 9. Perfil lipídico dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV que compõem a amostra do estudo – Teresina, Piauí, 2021.

Variáveis	N	Média (IC _{95%})	Mediana (IC _{quartis})
Colesterol total (mg/dL)	29	67,3 (56,4 – 78,2)	66,0 (59,5 – 75,5)
Triglicérides (mg/dL)	29	79,1 (66,9 – 91,3)	76,0 (54,0 – 102,5)
HDL (mg/dL)	29	33,3 (26,6 – 32,9)	35,0 (17,0 – 41,5)
VLDL (mg/dL)	29	15,8 (13,4 – 15,2)	15,8 (6,1 – 23,5)
LDL (mg/dL)	29	18,1 (12,3 – 23,9)	15,2 (10,8 – 20,5)

N: número de indivíduos. IC_{quartis} = Intervalo dos quartis.

Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, 2021.

6.4 Avaliação da correlação entre o perfil lipídico com a quantidade de doses de anfotericina B lipossomal

A Tabela 10 apresenta a correlação dos níveis do perfil lipídico com a quantidade de doses de anfotericina B lipossomal, considerando cada frasco de 50 mg do fármaco. Na análise não foi observada nenhuma correlação estatística.

Tabela 10. Correlação dos níveis séricos de colesterol, triglicérides HDL, VLDL e LDL com a quantidade de doses de anfotericina B lipossomal administradas em indivíduos com LV coinfectados pelo HIV – Teresina, Piauí, 2021.

Variáveis	R	R ²	p-valor
Colesterol total (mg/dL)	0,158	0,025	0,451 ^b
Triglicérides (mg/dL)	0,043	0,002	0,837 ^a
HDL (mg/dL)	0,078	0,006	0,713 ^a
VLDL (mg/dL)	0,275	0,075	0,184 ^b
LDL (mg/dL)	0,043	0,002	0,837 ^a

r = coeficiente de correlação; R² = coeficiente de determinação; ^acorrelação de Pearson; ^bcorrelação de Spearman.

Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, 2021.

A Tabela 11 apresenta a correlação dos níveis do perfil lipídico com a quantidade de doses de anfotericina B lipossomal dos participantes divididos em dois grupos (recidivante e não recidivante), para isto, considerou-se cada frasco de 50 mg do fármaco. Na análise não foi observada nenhuma correlação estatística.

Tabela 11. Correlação dos níveis séricos de colesterol, HDL, triglicérides, LDL e VLDL com a quantidade de doses de anfotericina B lipossomal administradas em com LV coinfectados pelo HIV – Teresina, Piauí, 2021.

Variáveis	Recidivante (n=23)			Não recidivante (n=6)		
	r	R ²	p-valor	r	R ²	p-valor
Colesterol total (mg/dL)	0,139	0.0756	0,559 ^a	-0,154	0.1962	0,805 ^b
Triglicérides (mg/dL)	-0,188	0.1962	0,427 ^a	0,088	0.1246	0,888 ^a
HDL (mg/dL)	-0,065	0.1354	0,786 ^a	0,157	0.1552	0,801 ^a
VLDL (mg/dL)	0,388	0.1204	0,091 ^b	-0,178	0.2581	0,774 ^a
LDL (mg/dL)	-0,188	0.1962	0,427 ^a	0,088	0.1246	0,888 ^a

^acorrelação de Pearson; ^bcorrelação de Spearman.

Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, 2021.

6.5 Associação entre o perfil lipídico com o desfecho clínico e diagnóstico anterior de leishmaniose visceral

A Tabela 12 mostra o perfil lipídico dos indivíduos do estudo. Observou-se que houve diferença significativa em relação aos níveis de VLDL quanto ao óbito ($p < 0,004$). Em relação ao colesterol total, triglicérides, HDL e LDL não foram observadas associações estatisticamente significativas.

Tabela 12. Associação entre o perfil lipídico com o desfecho clínico dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV de acordo com o desfecho clínico – Teresina, Piauí, 2021.

Variáveis	Óbito		p-valor
	Não (N=25)	Sim (N=4)	
	Mediana (IC _{quartis})	Mediana (IC _{quartis})	
Colesterol total (mg/dL)	66,0 (59,5 – 75,5)	65,5 (35,5 – 81,3)	0,680 ^b
Triglicérides (mg/dL)	71,0 (54,0 – 95,0)	108,0 (53,2 – 138,0)	0,170 ^a
HDL (mg/dL)	34,0 (16,5 – 41,5)	36,5 (20,8 – 54,5)	0,644 ^a
VLDL (mg/dL)	18,8 (11,6 – 24,7)	1,7 (0,6 – 8,3)	0,004^b
LDL (mg/dL)	14,2 (10,8 – 19,0)	21,6 (10,7 – 27,6)	0,170 ^a

N: número de indivíduos; ^at de Student; ^bMann-Whitney. IC_{quartis} : Intervalo dos quartis.

Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, 2021.

A Tabela 13 apresenta o perfil lipídico dos indivíduos do estudo. Observou-se que houve diferença significativa em relação aos níveis de triglicérides e LDL quanto ao diagnóstico anterior de leishmaniose visceral entre os dois grupos ($p < 0,047$). Em relação ao colesterol total, VLDL e HDL não foram observadas associações estatisticamente significativas.

Tabela 13. Associação entre o perfil lipídico com o diagnóstico anterior de LV dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV de acordo com o desfecho clínico – Teresina, Piauí, 2021.

Variáveis	Diagnóstico de LV				p-valor
	Recidivante (N=23)		Não recidivante (N=6)		
	Média (IC95%)	Mediana (IC _{quartis})	Média (IC95%)	Mediana (IC _{quartis})	
Colesterol total (mg/dL)	60,5 (51,6 - 69,4)	65,0 (39,0 - 74,0)	93,2 (49,7 - 136,6)	71,0 (65,0 - 132,7)	0,084 ^b
Triglicérides (mg/dL)	73,2 (59,9 - 86,5)	70,0 (50,0 - 92,0)	102,0 (72,4 - 131,6)	102,5 (70,8 - 131,0)	0,047^a
HDL (mg/dL)	30,4 (23,7 - 37,0)	34,0 (16,0 - 40,0)	44,7 (20,4 - 68,9)	41,5 (26,2 - 69,5)	0,079 ^a
VLDL (mg/dL)	15,5 (9,8 - 21,2)	14,0 (5,6 - 21,8)	28,1 (7,6 - 48,6)	23,6 (15,7 - 40,4)	0,059 ^b
LDL (mg/dL)	14,6 (11,9 - 17,3)	14,0 (10,0 - 18,4)	20,4 (14,5 - 26,3)	20,5 (14,2 - 26,2)	0,047^a

N: número de indivíduos; ^at de Student; ^bMann-Whitney. IC_{quartis}: Intervalo dos quartis

Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, 2021.

A Tabela 14 apresenta os resultados da análise multivariada do perfil lipídico com o diagnóstico anterior de leishmaniose visceral entre os dois grupos. Não houve nenhuma diferença estatística.

Tabela 14. Análise multivariada do diagnóstico anterior de LV com o perfil lipídico dos indivíduos com LV coinfectados pelo HIV de acordo com o desfecho clínico – Teresina, Piauí, 2021.

Variáveis	Diagnóstico anterior de LV				Valor p	OR (IC _{95%})
	Recidivante (N=23)		Não recidivante (N=6)			
	n	%	n	%		
Colesterol total (mg/dL)						
< 190	23	(79,3)	6	(20,7)	-	
≥ 190	-	-	-	-		
HDL (mg/dL)						
≥ 40	5	(55,6)	4	(44,4)	0,056	1
< 40	18	(90,0)	2	(10,0)		7,20 (1,01 - 51,39)
Triglicérides (mg/dL)						
< 175	23	(79,3)	6	(20,7)	-	
≥ 175	-	-	-	-		
VLDL (mg/dL)						
≥ 45	22	(81,5)	5	(18,5)	0,377	1
< 45	1	(50,0)	1	(50,0)		0,23 (0,01 - 4,29)
LDL (mg/dL)						
< 50	23	(79,3)	6	(20,7)	-	

N: número de indivíduos; OR: odds ratio; IC_{95%}: Intervalo da odds ratio com 95% de confiança; Valor p: teste Exato de Fisher.

Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, 2021.

7 DISCUSSÃO

Neste estudo foi realizado o ensaio *in vitro* a fim de avaliar a sensibilidade à anfotericina B de isolados provenientes de indivíduos coinfectados HIV/LV. As diferenças nos valores de EC₅₀, não foram significativas. Isto confirma os achados de Lachaud *et al.* (2009), onde o valor de IC₅₀ (concentração inibitória) a anfotericina B de isolados primários variou muito pouco entre as cepas. Um dos achados mais importantes deste estudo é que os parasitas que estiveram em contato com anfotericina B por muitos episódios não são menos suscetíveis à droga do que os isolados primários. Durand *et al.* (1998) utilizaram doses eficazes medianas de anfotericina B (ED₅₀) em um isolado obtido antes de qualquer tratamento e em um segundo isolado do mesmo paciente obtido quatro anos depois do tratamento com anfotericina B, mostraram que os valores de ED₅₀ eram semelhantes, demonstrando a estabilidade da dose mediana de anfotericina B (ED₅₀) após uma exposição prolongada ao medicamento, sugerindo que a falha do tratamento não foi devido à resistência do parasita, apesar de uma exposição prolongada à droga. Valores semelhantes de IC₅₀ foram observados entre promastigotas e amastigotas, apoiando ainda mais a ideia de que o estágio de vida do parasita não parece influenciar a suscetibilidade à anfotericina B (CALLAHAN *et al.*, 1997). O fracasso da terapia para LV é, portanto, provavelmente atribuído a outros fatores que não a resistência ao fármaco. Outra questão seria a padronização de protocolos, que levaria à padronização das condições utilizadas para testar a suscetibilidade aos medicamentos, a fim de comparar os resultados entre os laboratórios.

Neste estudo foi realizada a avaliação do perfil lipídico de indivíduos coinfectados HIV/LV, assim como, foi estudada a existência da associação entre o perfil lipídico com a quantidade de doses de anfotericina B lipossomal administradas, desfecho clínico e com diagnóstico anterior de LV. Ainda foi observado se haveria alguma associação entre os dados laboratoriais e o diagnóstico anterior de LV.

A população de estudo foi representada por indivíduos adultos com idades entre 27 e 82 anos de idade, com maior frequência do sexo masculino, dados estes, semelhantes aos observados na literatura (COTA *et al.*, 2011; ABREU, 2018;). A LV é descrita com maior frequência na população masculina. Uma hipótese seria que diferenças biológicas relacionadas ao sexo facilitam a progressão de LV. Rodríguez *et al.* (2018) investigaram, se existiria um risco aumentado na progressão da doença para infecção sintomática em homens infectados por *L. infantum*, onde observaram níveis mais altos de interleucina-12 (IL-12) em mulheres, enquanto os homens tinham níveis significativamente mais altos de

fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-10 (IL-10), o que poderia favorecer uma carga maior de parasitas de *L. infantum* nos homens e limitar a capacidade de desenvolver uma resposta de células T protetora (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). Outra provável hipótese está relacionada aos níveis de testosterona em homens adultos. A testosterona exerce efeitos imunossupressores, aumentando assim a gravidade de algumas doenças infecciosas como leishmaniose, malária, amebíase e tuberculose, ao mesmo tempo que favorece a eliminação da toxoplasmose (BERNIN; LOTTER, 2014; GIEFING-KRÖLL *et al.*, 2015).

Leishmaniose visceral e HIV são doenças endêmicas no Brasil, país que reporta a maioria das coinfeções nas Américas. Dos 250 casos reportados de coinfeção HIV/LV em 2018, 246 foram registrados no Brasil (OPAS, 2019). A LV é considerada uma infecção oportunista no contexto da coinfeção pelo HIV. Especialmente na coinfeção HIV/LV, uma situação preocupante é o aumento da recaída (recidiva) e letalidade. Os fatores preditivos desses resultados ainda são pouco conhecidos. A baixa contagem de linfócitos T CD4 +, nenhum aumento nessa contagem destas células e a ausência de profilaxia secundária contra a LV em pacientes infectados pelo HIV contribuem para o aumento da recaída e letalidade (COTA *et al.*, 2011).

A letalidade da população com a coinfeção HIV/*Leishmania* registrada neste estudo corresponde a 13,8%, colaborando com a literatura, onde Gomes (2012) encontrou 25% de mortalidade nos coinfectados HIV/LV, sendo três vezes maior do que nos não coinfectados. Vários autores relataram uma maior taxa de letalidade entre pacientes coinfectados com HIV /LV, e a causa de morte destes indivíduos sendo outras condições associadas ao HIV, como doenças oportunistas e complicações terapêuticas (PETERS *et al.*, 1990; PINTADO *et al.*, 2001; MARQUES *et al.*, 2007; COTA *et al.*, 2011). No entanto, Lopez-Velez, Casado e Pintado (2001) destacaram a possibilidade da contribuição da LV para a morte, seja por imunossupressão independente do HIV, seja por estimulação da replicação do HIV.

Neste estudo, 23 (79,3%) indivíduos apresentaram recidivas. A tendência à recidiva é uma das características mais observadas em pessoas com coinfeção pelo HIV/*Leishmania*. Fernández-Guerrero *et al.* (2004) descreveram que 40% dos indivíduos HIV positivos tiveram uma ou mais recidivas. Alexandrino-de-Oliveira *et al.* (2010) relataram uma ou mais recidivas em 13 pacientes coinfectados de um total de 23 casos, representando 56,5% das recidivas. Ramos *et al.* (2017) mostrou uma taxa de recidiva de

32,7% em pacientes coinfectados HIV/LV. Recentemente em uma coorte realizada na Etiópia durante o período de quatro anos mostrou que 12 indivíduos coinfectados HIV/LV apresentaram mais de dois episódios de LV, totalizando 48 episódios de LV, variando de três a nove episódios por indivíduo. Globalmente, a taxa de coinfecção HIV/LV é estimada em 2% a 9% em áreas endêmicas, mas pode chegar a mais de 15% em algumas partes do noroeste da Etiópia, por exemplo (MOHAMMED *et al.*, 2020). Os casos de recidiva desta coinfecção vêm sendo descritos em estudos, principalmente em coortes ou em casos isolados (SILVA *et al.*, 2013; McQUARRIE *et al.*, 2015; ABONGOMERA *et al.*, 2017; MASTROIANNI *et al.*, 2018; MOHAMMED *et al.*, 2020). Segundo Bourgeois *et al.* (2010), esses pacientes apresentam uma nova entidade nosológica chamada “leishmaniose visceral crônica ativa”. Esta condição pode ser denominada de “crônica” devido à presença de recidivas durante um período de vários anos e “ativa” devido à circulação contínua do parasita.

A adesão à TARV (terapia antirretroviral) foi observada em 22 (75,9%) indivíduos e sete indivíduos (24,1%) mostraram uma má adesão (interrupções no tratamento) à TARV. O uso de TARV, descrito em estudos anteriores mostrou melhora significativa na sobrevivência de pacientes coinfectados com HIV/*Leishmania*. No entanto, as recidivas de LV ocorrem em pacientes em TARV, apesar do aumento no número de TCD4+ e cargas indetectáveis de HIV (PINTADO *et al.*, 2001; GIL-PRIETO *et al.*, 2011).

No Brasil, o tratamento utilizado na LV é feito primariamente com antimoniais pentavalentes em indivíduos não infectados pelo HIV. Para indivíduos acometidos pela coinfecção HIV/*Leishmania*, o fármaco recomendado em primeira linha é a anfotericina B lipossomal. Todos os participantes deste estudo foram tratados com anfotericina B lipossomal, conforme o que é preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2015).

Apesar do número elevado de casos reportados desta coinfecção no nível mundial, o tratamento de escolha ainda permanece controverso. É importante ressaltar que faltam evidências científicas que estabeleçam a dose ideal de anfotericina B lipossomal para o tratamento de indivíduos coinfectados HIV/LV, contudo a administração de anfotericina B lipossomal veio permitir uma maior eficácia em regimes terapêuticos mais curtos, uma redução do tempo de hospitalização e uma diminuição dos efeitos secundários, como é o caso da nefrotoxicidade. No entanto, trata-se de uma opção com custos mais elevados (MARQUES *et al.*, 2007; BRASIL, 2015).

Neste estudo, as manifestações clínicas mais frequentes foram perda de peso, palidez, febre, esplenomegalia e hepatomegalia, alguns desses resultados são semelhantes ao que está descrito na literatura (PINTADO *et al.*, 2001; ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2010; CIPRIANO *et al.*, 2017; SOUSA-GOMES *et al.*, 2017). Por outro lado, alguns autores afirmam que estes indivíduos podem apresentar diferentes manifestações clínicas, como ausência de visceromegalia ou febre (FERNANDEZ-GUERRERO *et al.*, 1987). Outros parâmetros como icterícia, apatia, vômito, diarreia e dispneia também foram notados que quando associados podem ser sugestivos de um mau prognóstico.

O comprometimento hematológico é frequente na LV, onde a anormalidade mais comum é a pancitopenia. Dentre as variáveis laboratoriais observadas à admissão e às readmissões, a anemia e a leucopenia foram os achados mais frequentes entre os indivíduos, dados que são condizentes com a literatura (MAHAJAN; MARWAHA, 2007; AGRAWAL *et al.*, 2013; ABREU, 2018). Cota *et al.* (2014) demonstrou que trombocitopenia é um fator determinante para óbito. Cipriano *et al.* (2017) relataram em seus achados laboratoriais a pancitopenia (39,1%). A contagem de linfócitos CD4 estava abaixo de 100 células/ μ L em 14 (50%) participantes, dados que estão de acordo com a literatura (ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2010; MASTROIANNI *et al.*, 2018; SIMÃO; VICTÓRIA; FORTALEZA, 2020). Como dito anteriormente, uma baixa contagem de células TCD4 pode contribuir com a taxa de recidiva e letalidade em indivíduos coinfectados HIV/LV.

O único paciente com LV não recidivante que tinha dados de albumina e globulina, apresentava hipoalbuminemia e hiperglobulinemia mais extremas que os pacientes com LV recidivante. Como se trata de um único caso, deve-se ter cautela na interpretação do achado. As duas alterações estão ligadas à IL-6. De um lado, a hipoalbuminemia é parte da reação da fase aguda mediada principalmente por IL-6 mas também por IL-1 β e TNF- α , enquanto a hiperglobulinemia parece ser devida à promoção da maturação de células B induzida particularmente por IL-6 (MARKANDAY, 2015; HUNTER; JONES, 2015).

Na avaliação do perfil lipídico foi observado níveis de colesterol total, triglicérides, dentro da normalidade. Contudo, observa-se elevação nos níveis de triglicérides e redução nos níveis de colesterol total em indivíduos com LV (LIBEROPOULOS *et al.*, 2002; LAL *et al.*, 2007; OTTONI, 2010; SOARES *et al.*, 2010;

AGOURIDIS *et al.*, 2012). Um dos mecanismos possíveis para o perfil lipídico alterado em indivíduos com LV pode ser devido ao sequestro ou degradação das lipoproteínas no aumento do baço e fígado (NANJEE *et al.*, 2000; LIBEROPOULOS *et al.*, 2002). É possível que a infecção por HIV tenha sido responsável pela redução dos triglicérides (NGUEMAÏM *et al.*, 2010; FOURIE *et al.*, 2010; ADEWOLE *et al.*, 2010).

O colesterol de membrana é essencial para a ligação e entrada de *Leishmania* nos macrófagos, tendo papel fundamental na organização, dinâmica e função celular, através de domínios denominados “lipid rafts”, responsáveis por coordenar eventos de transdução e servir de porta de entrada para alguns patógenos (LAL *et al.*, 2007; LAL *et al.*, 2010). Estudos experimentais indicam que a entrada de promastigotas nas células hospedeiras, pode ser inibida com a depleção do colesterol nos macrófagos, no qual se observa redução do número de amastigotas intracelularmente (PUCADYL; CHATTOPADHYAY, 2012). As etapas pelas quais essas alterações ocorrem ainda permanecem desconhecidas, porém acredita-se que o parasito interfira na biossíntese do colesterol, promovendo a menor expressão de enzimas, como a enzima HMG-CoA redutase, enzima responsável pelo controle da síntese do colesterol no organismo (RUB *et al.*, 2009). Estudos recentes têm mostrado que os triglicérides são fundamentais para o crescimento da *Leishmania in vitro*, e que existe uma forte correlação positiva entre a hipertrigliceridemia e a carga parasitária em pacientes com LV (LAL *et al.*, 2015).

Os níveis de HDL nos indivíduos coinfectados HIV/LV deste estudo estavam abaixo do valor desejável em 20 (68,5%) participantes, dado já descrito (GATTO *et al.*, 2013; OTTONI, 2010; SOARES *et al.*, 2010). Uma hipótese para níveis de HDL reduzidos seria a inflamação aguda na LV que pode levar a alteração da composição e o metabolismo das lipoproteínas, resultando em propriedades anti-inflamatórias reduzidas, em particular para as partículas de HDL (DE LA LLERA MOYA *et al.*, 2012). Em relação aos níveis de LDL e VLDL, todos os indivíduos apresentaram níveis muito abaixo do limite inferior. Carvalho *et al.* (2014) observaram aumento de 29% de parasitas nos macrófagos que foram incubados por seis horas com VLDL do que em cultura sem adição de lipoproteína. A adição de HDL reduziu significativamente (37%) a carga parasitária em comparação com VLDL, sugerindo que o HDL teria um papel protetor durante a infecção. É sabido que o HDL possui propriedades pleiotrópicas como por exemplo, é um protetor antiaterogênico, possui funções anti-inflamatórias, antiapoptóticas ou antioxidantes (TRAN-DINH *et al.*, 2013; SANTOS-GALLEGO; BADIMON;

ROSENSON, 2014). Devido aos seus efeitos protetores pleiotrópicos, o HDL pode representar um potencial alvo terapêutico futuro a ser explorado na LV.

Quanto à falta de correlação dos níveis séricos do perfil lipídico com a quantidade de doses de anfotericina B lipossomal administradas nos participantes não foi possível estabelecer nenhuma hipótese explicativa. Curiosamente, os indivíduos com doença letal tiveram níveis muito menores de VLDL ($p < 0,004$). Apesar de não haver estudos descritos na literatura a respeito desta associação, Lal *et al.* (2015) descreveu alterações nos níveis de VLDL em indivíduos com LV grave. Uma das hipóteses é que a uma diminuição da atividade da lipase de lipoproteína e da lipase hepática resultam em retardo da liberação de VLDL e consequente conversão de VLDL para LDL. A VLDL desempenha um papel na transferência de triglicérides e colesterol do fígado ao tecido muscular e adiposo. O mecanismo que controla sua produção é mal compreendido e sua aquisição pelos tecidos depende da atividade de enzimas como a lipoproteína lipase endotelial, que pode ser prejudicada em indivíduos com LV (NANJEE *et al.*, 2000; LIBEROPOULOS *et al.*, 2002).

Observou-se que houve diferença significativa em relação aos níveis de triglicérides e LDL quanto ao diagnóstico anterior de LV entre os grupos recidivante e não recidivante ($p < 0,047$). Uma hipótese para isso seria uma boa resposta ao tratamento, uma vez que os valores de triglicérides e LDL eram maiores no grupo de indivíduos que estavam em seu primeiro episódio de LV. Em relação ao colesterol total, VLDL e HDL não foram observadas associações estatisticamente significativas.

Apesar dos resultados apresentados não é possível afirmar se é o fato da LV ser recidivante ou se é o perfil lipídico alterado que levam à falha terapêutica à anfotericina B, pois não se pode apontar uma relação de causa e efeito. O que pôde-se observar é que o perfil lipídico nos indivíduos recidivante difere dos indivíduos não recidivante.

Este estudo apresenta algumas limitações, entre elas, o pequeno número de isolados testados. É sabido que teste de resistência à fármacos é útil na LV, pois diminui a chance de resistência ao tratamento e contribui em regiões onde outros fármacos possuem registro de falha terapêutica. Assim, a identificação dos mecanismos pelos quais a resistência à anfotericina B pode surgir é uma prioridade. Outro problema foi a padronização de protocolos, que levaria à padronização das condições utilizadas para

testar a suscetibilidade aos medicamentos, a fim de comparar os resultados entre os ensaios.

Outra limitação, foi o fato de não terem sido avaliadas as concentrações plasmáticas de apolipoproteína A1, apolipoproteína A2, apolipoproteína E e apolipoproteína B, e níveis de citocinas inflamatórias, bem como, avaliar e correlacionar estas apolipoproteínas a estas citocinas, como por exemplo a interleucinas IL-6, IL-10 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma vez que já foi observado que em pacientes com LV há alterações nos níveis séricos do perfil lipídico associadas ao aumento/diminuição destas citocinas.

Este estudo contribui na compreensão da importância destas alterações lipídicas em indivíduos HIV/LV, uma vez que, não há dados descritos na literatura. Estas alterações associadas a outras características clínicas e laboratoriais podem contribuir numa melhor avaliação, melhor manejo destes indivíduos, bem como, no monitoramento da resposta terapêutica. Uma sugestão para futuros projetos seria estabelecer grupos (LV, HIV/LV, controle, saudável) e compará-los, a fim de uma avaliação mais completa e consistente.

8 CONCLUSÃO

Por fim, não houve evidências de resistência à anfotericina B dos isolados obtidos de pacientes com LV recidivante e HIV. Entretanto, os menores níveis de lipídios séricos de pacientes com LV recidivante abre a possibilidade de que os baixos níveis dos lipídios podem ter interferido com a ação do fármaco e propiciado refratariedade à anfotericina B de pacientes com LV e HIV/AIDS. Tais achados, podem contribuir para tomadas de decisão clínica nesta população, como por exemplo, a inclusão de uma dieta hiperlipídica, principalmente com fontes alimentares de HDL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Djanira Carvalho de. Ocorrência de óbitos relacionados a coinfeção leishmaniose/hiv em pacientes em hospital de referência do estado do maranhão. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Maranhão, 2018.

ABONGOMERA, Charles et al. The risk and predictors of visceral leishmaniasis relapse in human immunodeficiency virus-coinfected patients in Ethiopia: a retrospective cohort study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 10, p. 1703-1710, 2017.

ADEWOLE, O. O. et al. Lipid profile in HIV/AIDS patients in Nigeria. **African health sciences**, v. 10, n. 2, 2010.

AGOURIDIS, Aris P. et al. New-onset extremely low levels of high-density lipoprotein cholesterol. **Journal of clinical lipidology**, v. 6, n. 6, p. 593-595, 2012.

AGRAWAL, Y. et al. Hematological profile in visceral leishmaniasis. **International Journal of Infection and Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 39-44, 2013.

ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA, Priscilla et al. HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 692-697, 2010.

ALVAR, Jorge et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 2, p. 334-359, 2008.

ALVAR, Jorge et al. Leishmania and human immunodeficiency vírus coinfection: the first 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 298-319, 1997.

AKUFFO, Hannah et al. New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 5, p. e0006375, 2018.

ANDRADE, Tarcisio M.; CARVALHO, Edgar M.; ROCHA, Heonir. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. **Journal of infectious diseases**, v. 162, n. 6, p. 1354-1359, 1990.

BERNIN, Hannah; LOTTER, Hanna. Sex bias in the outcome of human tropical infectious diseases: influence of steroid hormones. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. suppl_3, p. S107-S113, 2014.

BANSAL, Devendra; BHATTI, Harinderpal Singh; SEHGAL, Rakesh. Role of cholesterol in parasitic infections. **Lipids in health and disease**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2005.

BATISTA, Joilson Ferreira et al. Transmission of *Leishmania infantum* from cats to dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV**,

2015. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/manual-recomendacoes-diagnostico-leishmania-hiv-BRA.pdf?ua=1>. Acesso em 18 de ago de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>. Acesso em 18 de ago de 2019.

BEKAERT, Etienne et al. Alterations in lipoprotein density classes in infantile visceral leishmaniasis: presence of apolipoprotein SAA. **European journal of clinical investigation**, v. 22, n. 3, p. 190-199, 1992.

BEKAERT, Etienne et al. Plasma lipoproteins in infantile visceral leishmaniasis: deficiency of apolipoproteins AI and A-II. **Clinica chimica acta**, v. 184, n. 2, p. 181-191, 1989.

BERMAN, J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Cur Opin Infect Dis*, v. 16, p. 397-401, 2003.

BERTOLI, A et al. Visceral leishmaniasis presenting with hypertriglyceridaemia. **Visceral leishmaniasis presenting with hypertriglyceridaemia**, v. 2, p. 504-505, 1982.

BOURGEOIS, Nathalie et al. 'Active chronic visceral leishmaniasis' in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. **HIV medicine**, v. 11, n. 10, p. 670-673, 2010.

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Leishmaniasis**. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 18 de setembro de 2021.

CALLAHAN, Heather L. et al. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 818-822, 1997.

CAPELA, Rita; MOREIRA, Rui; LOPES, Francisca. An Overview of Drug Resistance in Protozoal Diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 22, p. 5748, 2019.

CARVALHO, Márcia Dias Teixeira et al. Lipoprotein lipase and PPAR alpha gene polymorphisms, increased very-low-density lipoprotein levels, and decreased high-density lipoprotein levels as risk markers for the development of visceral leishmaniasis by *Leishmania infantum*. **Mediators of inflammation**, v. 2014, 2014.

CARTWRIGHT, George E.; CHUNG, Hui-Lan; CHANG, A. N. Studies on the pancytopenia of kala-azar. **Blood**, v. 3, n. 3, p. 249-275, 1948.

CHAKRABORTY, Debabani et al. Leishmania donovani affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 3214-3224, 2005.

CIPRIANO, Patrícia et al. Leishmaniose Visceral em Doentes com Infecção HIV: O Desafio da Recaída e Falência Terapêutica. **Acta Medica Portuguesa**, v. 30, n. 6, 2017.

COTA, Gláucia. F.; SOUSA, Marcos R. de; RABELLO, Ana. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. **PLoS one neglected tropical diseases**, v. 5, n. 6, p. 1153, 2011.

COTA, Gláucia et al. Leishmania-HIV co-infection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 4, p. e2816, 2014.

COTA, Gláucia Fernandes et al. Exploring prognosis in chronic relapsing visceral leishmaniasis among HIV-infected patients: Circulating Leishmania DNA. **Acta Tropica**, v. 172, p. 186-191, 2017.

COSTA, Carlos H. N; PEREIRA, Humberto F.; ARAÚJO, Maurílio V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista da Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.

COSTA, Dorcas L. et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and global health**, v. 107, n. 2, p. 78-87, 2013.

CRUZ, I. et al. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. **The Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1124-1125, 2002.

DANTAS, Ive Maíra de Carvalho. **Perfil lipídico na leishmaniose visceral em hamster e expressão de mRNA de genes relacionados ao metabolismo lipotéico**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2013.

DAVE, Joel A. et al. Anti-retroviral therapy increases the prevalence of dyslipidemia in South African HIV-infected patients. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0151911, 2016.

DE LA LLERA MOYA, Margarita et al. Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo. **Atherosclerosis**, v. 222, n. 2, p. 390-394, 2012.

DE LA LOMA, AJEJAR et al. Leishmaniasis or AIDS? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 3, p. 421-422, 1985.

DE OLIVEIRA, Janaina Michelle et al. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, 2010.

DIRO, Ermias et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in East Africa. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 6, p. e2869, 2014.

DNDi. Drugs for Neglected Diseases *initiative*. Rumo a uma nova geração de tratamentos para leishmanioses, 2019. Disponível em:

<https://www.dndi.org/wpcontent/uploads/2019/09/DNDiLeishmaniasis2019POR.pdf>.
Acesso em: 31 de março 2020.

DOS SANTOS, Priscila L. et al. The severity of visceral leishmaniasis correlates with elevated levels of serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004375, 2016.

DURAND, Remy et al. Leishmania infantum: lack of parasite resistance to amphotericin B in a clinically resistant visceral leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 8, p. 2141-2143, 1998.

DURO, M. et al. Lipid profile changes by high activity anti-retroviral therapy. **Clinical biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 740-744, 2013.

FERNÁNDEZ-GUERRERO, Manuel L. et al. Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts. **The American journal of medicine**, v. 83, n. 6, p. 1098-1102, 1987.

FERNÁNDEZ-GUERRERO, Manuel L. et al. Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis. **Acta tropica**, v. 90, n. 1, p. 11-16, 2004.

FERNÁNDEZ-MIRANDA, Consuelo et al. Lipoprotein alterations in patients with HIV infection: relation with cellular and humoral immune markers. **Clinica Chimica Acta**, v. 274, n. 1, p. 63-70, 1998.

FERREIRA, Gabriel Reis et al. Human competence to transmit Leishmania infantum to Lutzomyia longipalpis and the influence of human immunodeficiency virus infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 98, n. 1, p. 126, 2018.

FESSEL, W. Jeffrey; FOLLANSBEE, Stephen E.; REGO, John. High-density lipoprotein cholesterol is low in HIV-infected patients with lipodystrophic fat expansions: implications for pathogenesis of fat redistribution. **Aids**, v. 16, n. 13, p. 1785-1789, 2002.

FOURIE, Carla Maria T. et al. Lipid abnormalities in a never-treated HIV-1 subtype C-infected African population. **Lipids**, v. 45, n. 1, p. 73-80, 2010.

GATTO, Mariana et al. Biochemical and nutritional evaluation of patients with visceral leishmaniasis before and after treatment with leishmanicidal drugs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 735-740, 2013.

GIEFING-KRÖLL, Carmen et al. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. **Aging cell**, v. 14, n. 3, p. 309-321, 2015.

GHORBANI, Masoud.; FARHOUDI, Ramin. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 2018.

GIL-PRIETO, Ruth et al. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997–2008). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 85, n. 5, p. 820, 2011.

GOLUSZKO, P.; NOWICKI, B. Membrane cholesterol: a crucial molecule affecting interactions of microbial pathogens with mammalian cells. **Infection and immunity**, v. 73, n. 12, p. 7791-7796, 2005.

GOMES, Marcia Leite de Sousa. **Coinfecção leishmaniose visceral e Aids no Brasil, 2001 a 2010**. 2012. Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

HUNTER, Christopher A.; JONES, Simon A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nature immunology**, v. 16, n. 5, p. 448-457, 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/pi/teresina.html>. Acesso em: 27 de setembro de 2021.

JHA, TK et al. Miltefosine, na oral agente for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, n. 341, p. 1795-1800, 1999.

JJ, Shujing et al. Changes in lipid indices in HIV+ cases on HAART. **BioMed research international**, v. 2019, 2019.

LACHAUD, Laurence et al. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 2, p. e16-e22, 2009.

LAL, Chandra S. et al. Hypocholesterolemia and increased triglyceride in pediatric visceral leishmaniasis. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 382, n. 1-2, p. 151-153, 2007.

LAL, Chandra S. et al. Total sérum cholesterol determination can provide understating of parasite burden in patients with visceral leishmaniasis infection. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 2112-2113, 2010.

LAL, Chandra S. et al. Hypertriglyceridemia: a possible diagnostic marker of disease severity in visceral leishmaniasis. **Infection**, v. 44, n. 1, p. 39-45, 2015.

LIBEROPOULOS, Evagellos et al. Severe hypocholesterolemia with reduced serum lipoprotein (a) in a patient with visceral leishmaniasis. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 32, n. 3, p. 305-308, 2002.

LINDOSO, Jose Angelo et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3136, 2014.

LIMA, Iúri Paz et al. Human Immunodeficiency vírus/Leishmania infamtum in the first foci of urban American visceral leishmaniasis: clinical presentations from 1994 to 2010. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 156-160, 2013.

LOPEZ-VELEZ, R.; CASADO, J. L.; PINTADO, V. Decline of a visceral leishmaniasis epidemic in HIV-infected patients after the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, n. 7, p. 394-395, 2001.

MADALOSSO, Geraldine et al. American visceral leishmaniasis: factors associated with lethality in the state of São Paulo, Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.

MAHAJAN, Vikas; MARWAHA, R. K. Immune mediated hemolysis in visceral leishmaniasis. **Journal of tropical pediatrics**, v. 53, n. 4, p. 284-286, 2007.

MALMENDIER, C. L.; LONTIE, J.-F.; DUBOIS, D. Y. Mechanisms of hypocholesterolemia. **Hypercholesterolemia, Hypocholesterolemia, Hypertriglyceridemia, in Vivo Kinetics**, p. 173-182, 1990.

MARKANDAY, Anurag. Acute phase reactants in infections: evidence-based review and a guide for clinicians. In: **Open forum infectious diseases**. Oxford University Press, 2015. p. ofv098.

MARQUES, Nuno et al. Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana na era da terapêutica anti-retrovírica de alta eficácia. **Acta Med Port**. 2007; 20: 291–298, 2007.

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo Baptista. **Bioquímica básica**. 2017.

MASTROIANNI, Antonio et al. Two cases of relapsed HIV-associated visceral leishmaniasis successfully treated with combination therapy. **AIDS research and therapy**, v. 15, n. 1, p. 1-4, 2018.

MCQUARRIE, Shauna et al. Relapse of visceral leishmaniasis in an HIV-infected patient successfully treated with a combination of miltefosine and amphotericin B. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 325-329, 2015.

MEBAZAA, A. et al. Perturbations des lipides lipo-proteines sériques au cours du Kala-Azar. **Tunisie médicale**, v. 62, n. 2, p. 149-151, 1984.

MOHAMMED, Rezika et al. Multiple relapses of visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients: a case series from Ethiopia. **Current Therapeutic Research**, v. 92, p. 100583, 2020.

MOKHTARI, Maral; KUMAR, Perikala Vijayananda. Visceral leishmaniasis-associated hemophagocytosis: a single center experience. **Archives of Iranian medicine**, v. 16, n. 8, 2013.

MONGE-MAILLO, B.; LOPEZ-VELEZ, R. Treatment Options for Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection. **AIDS reviews**, v. 18, n. 1, p. 32-43, 2016.

MOUTZOURI, Elisavet; MOSES, Elisaf; LIBEROPOULOS, Evangelos N. Hypocholesterolemia. **Current vascular pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 200-212, 2011.

MURRAY, Henry W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NANJEE, M. N. et al. Lipid and apolipoprotein concentrations in prenodal leg lymph of fasted humans: associations with plasma concentrations in normal subjects, lipoprotein lipase deficiency, and LCAT deficiency. **Journal of lipid research**, v. 41, n. 8, p. 1317-1327, 2000.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Artmed, 2014.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**. 13. Ed. São Paulo: Atheneu, 2017.

NGUEMAÏM, N. F. et al. Serum lipid profile in highly active antiretroviral therapy-naïve HIV-infected patients in Cameroon: a case–control study. **HIV medicine**, v. 11, n. 6, p. 353-359, 2010.

OLIVIER, Martin et al. The pathogenesis of Leishmania/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. **Annals of Tropical Medicine Parasitol**, v. 97, suppl. 1, p. 79-98, 2003.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas nº 6 – Fevereiro**, 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/leishmaniasis>. Acesso em: 18 de ago 2019.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas Nº 7 – Março**, 2019. Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis. Acesso em: 18 de ago, 2019.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas nº 8 – Dezembro**, 2019. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>. Acesso em: 3 de jan 2020.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. Núm. 9 – Dezembro de 2020**. Washington, D.C.: OPAS; 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>. Acesso em: 18 de setembro de 2021.

OPS. Organización Panamericana de la Salud. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis em las Américas**, 2019. Disponível em: <http://iris.paho.org>. Acesso em: 18 de ago 2019.

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian journal of veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 1, 2015.

OTTONI, Cristina Iglesias. **A infecção por Leishmania infantum chagasi altera o metabolismo lipídico do hospedeiro**. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.

PETERS, BARRY S. et al. Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 77, n. 2, p. 1101-1111, 1990.

PINTADO, VICENTE et al. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients: a comparative study. **Medicine**, v. 80, n. 1, p. 54-73, 2001.

PONTE-SUCRE, Alicia; DIAZ, Emilia; PADRÓN-NIEVES, Maritza. The concept of fitness and drug resistance in Leishmania. In: **Drug Resistance in Leishmania Parasites**. Springer, Vienna, 2013. p. 431-449.

PONTE-SUCRE, Alicia et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017.

PUCADYIL, Thomas J. et al. Cholesterol is required for Leishmania donovani infection: implications in leishmaniasis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 133, n. 2, p. 145-152, 2004.

PUCADYIL, Thomas; CHATTOPADHYAY, A. Cholesterol: a potential therapeutic target in *Leishmania* infection?. **Trends in Parasitology**, v. 23, n.2, p. 49-53, 2012.

RAMOS, José M. et al. Is Visceral leishmaniasis different in immunocompromised patients without human immunodeficiency virus? A comparative, multicenter retrospective cohort analysis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 97, n. 4, p. 1127, 2017.

RAMOS, Thadzia Maria de Brito et al. Alterations in cholesterol, triglyceride and total phospholipid levels in plasma of *Callithrix jacchus* (sagüi) reinfected by *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 1, p. 37-40, 2004.

RODRÍGUEZ, Nilda E. et al. Epidemiological and experimental evidence for sex-dependent differences in the outcome of *Leishmania infantum* infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 98, n. 1, p. 142, 2018.

RUB, A et al. Cholesterol depletion associates with *Leishmania major* infection alter macrophage CD40 signalosome composition and effector function. **Nature Immunology**, v. 10, n. 3, p. 272-280, 2009.

RUSSO, R et al. Clinical survey of leishmania/HIV co-infection in Catania, Italy: the impact of highly active antiretroviral therapy (HAART). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, n. 97, p. 149-155, 2003.

SANTOS-GALLEGO, Carlos G.; BADIMON, Juan J.; ROSENSON, Robert S. Beginning to understand high-density lipoproteins. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 43, n. 4, p. 913-947, 2014.

SAPORITO, Laura. et al. Visceral leishmaniasis: Host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. e572–e576, 2013.

SEÇMEER, Gülten et al. Hypertriglyceridemia and decreased high-density lipoprotein could be a clue for visceral leishmaniasis. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 14, n. 6, p. 401-402, 2006.

SILVA, Francisca Conceição; MORGADO, Fernanda Nazaré. Leishmania spp-host interaction: there is always an onset, but is there an end? **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 330, 2019.

SILVA, Raizza Barros Sousa et al. Natural Infection by *Leishmania infantum* in domestic cats (*Felis catus*) in a municipality of moderate transmission in the Brazilian semi-arid region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, 2020.

SILVA, Elis Dionísio da et al. Case study of a patient with HIV-AIDS and visceral leishmaniasis co-infection in multiple episodes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 425-428, 2013.

SIMÃO, José Cláudio; VICTÓRIA, Cassiano; FORTALEZA, Carlos Magno Castelo Branco. Predictors of relapse of visceral leishmaniasis in inner São Paulo State, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 95, p. 44-49, 2020.

SOARES, Neci Matos et al. Plasma lipoproteins in visceral leishmaniasis and their effect on *Leishmania*-infected macrophages. **Parasite immunology**, v. 32, n. 4, p. 259-266, 2010.

SONDA, Sabrina; HEHL, Adrian B. Lipid biology of Apicomplexa: perspectives for new drug targets, particularly for *Toxoplasma gondii*. **TRENDS in Parasitology**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2006.

SOUSA-GOMES, Marcia et al. Co-infection *Leishmania*/HIV in Brazil: Epidemiological, Clinical and Laboratorial Aspects. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 519-526, 2011.

SOUSA-GOMES, Marcia; ROMERO, Gustavo Adolfo Sierra; WERNECK, Guilherme Loureiro. Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough?. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005772, 2017.

SUNDAR, Shyam et al. Oral miltefosine for indian leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, n. 347, p. 1739-1746, 2002.

TRAN-DINH, A. et al. HDL and endothelial protection. **British journal of pharmacology**, v. 169, n. 3, p. 493-511, 2013.

VAN GRIENSVEN, Johan; DIRO, Ermias. Visceral leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309-322, 2012.

VARMA, Neelam; NASEEM, Shano. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 26, n. 3, p. 78-82, 2010.

ZAULI-NASCIMENTO, Rogéria C. et al. In vitro sensitivity of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical Medicine & International Health**, v. 15, n. 1, p. 68-76, 2010.

WASAN, Kishor M. et al. Pharmacokinetics, distribution in serum lipoproteins and tissues, and renal toxicities of amphotericin B and amphotericin B lipid complex in a hypercholesterolemic rabbit model: single-dose studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 12, p. 3146-3152, 1998.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/disease/vector/en/>. Acesso em: 06 de abr 2020.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 20 de abr 2021.

WILSON, Mary E.; JERONIMO, Selma MB; PEARSON, Richard D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. **Microbial pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147-160, 2005.

WOLDAY, Dawit et al. Role of Leishmania donovani and its lipophosphoglycan in CD4+ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. **Infection and immunity**, v. 67, n. 10, p. 5258-5264, 1999.

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO CLÍNICO/AMBULATORIAL



INSTITUTO DE DOENÇAS TROPICAIS NATAN PORTELLA
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM LEISHMANIOSES- LABLEISH

FORMULÁRIO CLÍNICO/AMBULATORIAL

FORMULÁRIO CLÍNICO AMBULATORIAL

1. Dados do paciente

Nº no estudo: _____

Nº do prontuário: _____

Data de nascimento: _____/_____/_____

Sexo: () M () F

2. História clínica

Tempo de doença _____ dias

Perda de peso _____, se sim, quantificar _____kg

Febre ()

Palidez ()

Vômitos ()

Aumento do volume abdominal ()

Diarreia ()

Constipação intestinal ()

Dor abdominal ()

Tosse ()

Dispnéia ()

3. Exame físico

Peso _____kg

Estatura _____cm

Estado geral () 1. bom 2. regular 3. comprometido

Consciente () 1. sim 2. não 9. ignorado

Cor das mucosas () 1. boa 2. cianose de extremidades 3. cianose generalizada

Icterícia () 1. sim 2. não 9. ignorado

Lesões de pele () 1. sim 2. não 9. ignorado, se sim, especificar (tipo de lesão/tamanho/forma/contornos/ulceração/elevação/secreção):

Linfonodomegalia () 1. ausente 2. em 1-2 cadeias 3. em mais de 3 cadeias

Hidratação () 1. hidratado 2. desidratado i 3. desidratado ii 4. desidratado iii 9. ignorado

Edema () 1. ausente 2. edema de mmii 3. edema generalizado

Estado nutricional () 1. eutrófico 2. desnutrido i 3. desnutrido ii 4. desnutrido iii 9. ignorado

Esplenomegalia () 1. sim 2. não 9. ignorado, se sim, baço a _____ cm do bce, na linha hemiclavicular, em direção à ponta

Hepatomegalia () 1. sim 2. não 9. ignorado, se sim, fígado a _____ cm do bcd e _____ cm do apêndice xifóide

Adesão à terapêutica anti-retroviral: () completa () parcial > 50% () parcial 50% () não adesão

Hematócrito: _____ %

Hemácias: _____ 10^6

Plaquetas: _____ mm^3

Leucócitos: _____ mm^3

Contagem de células CD4: _____ células/ μl

Carga viral/HIV: _____ cópias/ml

Pesquisa direta para leishmania () positiva () negativa

Cultura para leishmania () positiva () negativa

Data de diagnóstico _____/_____/_____

Diagnóstico anterior de LV () 1. sim 2. não 9. ignorado

Data: _____/_____/_____

4. Terapêutica utilizada

Terapia de suporte () 1. sim 2. não 9. ignorado

() antibióticos

() concentrado de hemácias

() concentrado de plaquetas

() plasma

() vitamina k

() complexo protrombínico

() ácido acetil salicílico ou terapia anticoagulante

Terapia específica () 1. sim 2. não 9. ignorado

() antimonial de n metil glucamina

data: ____/____/____

() desoxicolato de anfotericina b

data: ____/____/____

() miltefosina

data: ____/____/____

5. Complicações () 1. sim 2. não 9. ignorado

() Infecção urinária

() Insuficiência renal

() Pneumonia

() Infecção cutânea ou do tecido celular subcutâneo

() Sepsis

() Hemorragia

() Convulsões

Outras: _____

6. Co-morbidades () 1. sim 2. não 9. ignorado

() hiv/aids

() uso de drogas imunossupressoras

() câncer, especificar: _____

() transplante, especificar: _____

() doença renal crônica

() doença hepática crônica

Outra: _____

7. Evolução clínica

Nº de dias de febre após o início da terapia específica: ____ dias

Tamanho do baço à saída do hospital: _____ cm do rce

Tamanho do fígado à saída do hospital: _____ cm do rcd

() Alta hospital com melhora

() Alta hospital sem melhora

() Transferência para uti

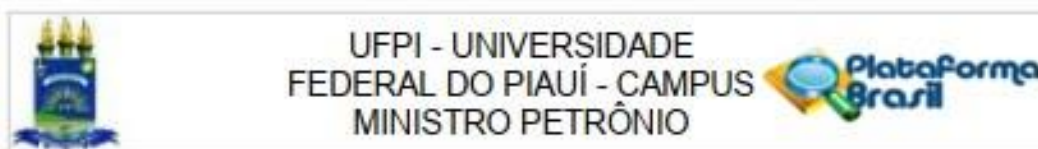
() Transferência para outro serviço

() Óbito

Data: ____/____/____

Causa mortis: _____

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IN VITRO DA SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS DE L. INFANTUM A ANFOTERICINA B E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MARCADORES DE RESISTÊNCIA

Pesquisador: RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 88901818.9.0000.5214

Instituição Proponente: Universidade Federal do Piauí - UFPI

Patrocinador Principal: SENADO FEDERAL
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.276.499

Apresentação do Projeto:

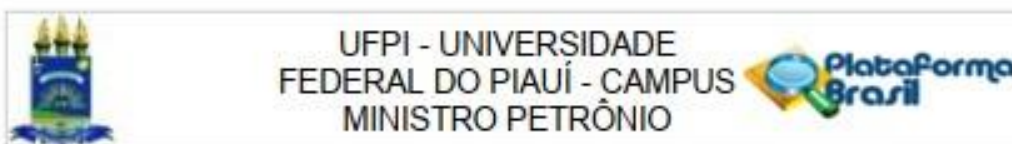
O protocolo trata-se de uma Emenda para ver se existe uma relação entre a concentração total de colesterol sérico e lipoproteico em pacientes coinfectados HIV/LV hipercolesterolêmicos administrados com anfotericina B. A Leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar é uma doença infecciosa parasitária causada por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero Leishmania é uma doença tropical negligenciada que causa significativa morbidade e mortalidade em todo o mundo. É causada por parasitas do gênero Leishmania que circulam entre a forma de promastigota flagelar no intestino do vetor de insetos e o estágio de amastigota não móvel no hospedeiro dos vertebrados. A leishmaniose é uma doença complexa e tem um impacto notável na saúde pública global e foi considerada como uma das seis principais doenças tropicais pela Organização Mundial da Saúde. Além disso, a infecção leishmanial tornou-se complicada com a coinfeção da AIDS e obteve importância substancial em pessoas infectadas pelo HIV como uma infecção oportunista em regiões onde ambas as infecções são endêmicas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Verificar a ocorrência de resistência à anfotericina B em pacientes coinfectados com

Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella.
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



Continuação do Parecer: 3.276.499

HIV/Leishmaniose Visceral (*Leishmania Infantum*).

Objetivo Secundário:

• Avaliar a susceptibilidade à anfotericina B de promastigotas de *L. Infantum*; • Avaliar a susceptibilidade à droga em amastigotas intracelulares de isolados de *L. Infantum*; • Determinar se a resistência é relacionada a uma diminuição da incorporação da droga pelo parasita; • Descrever os fatores potencialmente envolvidos no mecanismo de resistência nos isolados menos suscetíveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

No que se refere aos riscos considerando a Resolução 466/12 quando diz que toda pesquisa envolvendo seres humanos representa riscos ao participante, o presente estudo representará riscos mínimos aos participantes, pois o mesmo será desenvolvido com o uso de amostras do banco de dados do laboratório e dados do prontuário. Os riscos para o pesquisador responsável serão minimizados com o uso obrigatório de EPI'S.

Benefícios:

Trará benefícios para os pacientes e pesquisadores, pois responderá uma questão básica que persiste em relação ao tratamento de leishmaniose visceral, bem como, tentar escolher uma melhor estratégia de tratamento à estes pacientes e entender melhor o que ocorre para que haja tantas recidivas neste grupo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante sobre a Leishmaniose visceral e o tratamento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão anexados no protocolo de pesquisa.

Recomendações:

Sem recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo de pesquisa encontra-se de acordo com a Resolução 466/2012, apto para ser desenvolvido tem parecer de aprovado. Solicita-se que seja enviado ao CEP/UFPI/CMPP o relatório parcial e o relatório final desta pesquisa. Os modelos encontram-se disponíveis no site: <http://ufpi.br/cep>

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella.
 Bairro: Ininga CEP: 64.049-550
 UF: PI Município: TERESINA
 Telefone: (86)3237-2332 Fax: (86)3237-2332 E-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br



UFPI - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PIAUÍ - CAMPUS
MINISTRO PETRÔNIO



Continuação do Parecer: 3.276.499

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_124318_2_É1.pdf	12/04/2019 22:34:10		Acelto
Outros	justificativaldhdL.docx	12/04/2019 22:32:39	RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetoanfbc completo.docx	20/02/2019 23:34:07	RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA	Acelto
Outros	curriculorenata.pdf	01/05/2018 17:32:19	RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA	Acelto
Outros	curriculoprofcarlos.pdf	01/05/2018 17:31:25	RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA	Acelto
Outros	solicitacaolsencaotcle.docx	01/05/2018 17:28:42	RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA	Acelto
Outros	Instrumentodecoleta.docx	01/05/2018 17:28:02	RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA	Acelto
Outros	cartadeencam.doc	01/05/2018 17:27:27	RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA	Acelto
Outros	TCF.doc	29/04/2018 09:35:40	RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Doc2.pdf	29/04/2018 09:15:13	RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA	Acelto
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	29/04/2018 09:13:58	RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorInstitucional.pdf	13/04/2018 16:42:49	RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOamb.docx	13/04/2018 16:41:39	RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

TERESINA, 22 de Abril de 2019

Assinado por:

María do Socorro Ferreira dos Santos
(Coordenador(a))

Endereço: Campus Universitário Ministro Petrônio Portella.
Bairro: Ininga CEP: 64.049-550
UF: PI Município: TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 Fax: (86)3237-2332 E-mail: cep.ufpi@ufpLedu.br

ANEXO B – TERMO DE COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DOS DADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
Departamento de Medicina Comunitária
Instituto de Doenças Tropicais Nathan Portella
Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses
Av. Gov. Arthur de Vasconcelos 151, Centro Sul - Teresina / Piauí, Brasil;
CEP 64.001-450 – Telefone: (86) 3222-4377

TERMO DE COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DOS DADOS

Declaro ter ciência e comprometo-me a cumprir os termos da Resolução nº 466/12, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde e demais resoluções complementares à mesma (240/97, 251/97, 292/99 e 340/2004) que dispõe sobre “Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa em seres humanos”, assim como:

- Apresentar relatório do estudo trimestralmente ou quando for solicitado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
- Comunicar alterações no projeto e seu desenvolvimento
- Obter autorização do Comitê de Ética em Pesquisa para a apresentação de resultados parciais
- Publicar os resultados em periódico científico


Como responsável por este estudo, assino o presente Termo de Compromisso.

Teresina, 27 de fevereiro de 2018

Renata Vieira de Sousa Silva.

Renata Vieira de Sousa Silva
Universidade Federal do Piauí–UFPI
Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde
Fone: (86) 9 9812-6777
E-mail: renatisvieira@hotmail.com

ANEXO C – PROTOCOLO DE DESCONGELAMENTO DE CEPAS

	INSTITUTO DE DOENÇAS TROPICAIS NATAN PORTELLA LABORATÓRIO DE PESQUISA EM LEISHMANIOSES- LABLEISH
	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)
	TÍTULO: DESCONGELAMENTO DE AMOSTRAS RETIRADAS DO CRIOBANCO

PROCEDIMENTOS

1. Equipamentos
 - a) Cabine de segurança biológica;
 - b) Microscópio óptico;
 - c) Estufa incubadora de BOD;
 - d) Banho-maria;
 - e) Vasilhame de descarte.
2. Reagente
 - a) Meio de cultura Schneider's;
 - b) Meio de cultura NNN;
 - c) Solução de hipoclorito (água sanitária) ou álcool 70%.
3. Materiais
 - a) Pipeta Pasteur de vidro e/ou sorológica graduada estéril;
 - b) Bulbos de látex;
 - c) Pipetador automático;
 - d) Lâminas;
 - e) Lamínulas.
4. EPIs
 - a) Luva de procedimento;
 - b) Jalecos de mangas compridas descartáveis;
 - c) Sapatos fechados.

DESCONGELAMENTO DE AMOSTRAS

- a) Todo procedimento de descongelamento deverá ser feito na cabine de segurança biológica;
- b) Previamente ao descongelamento, a cabine de segurança biológica deverá ser devidamente higienizada utilizando água sanitária ou álcool 70%. Após a higienização, a luz UV deverá ser ligada por 10 minutos;
- c) Retirar os meios NNN e Schneider's previamente da geladeira para estabilização à temperatura ambiente;
- d) Verificar a localização das amostras no botijão de nitrogênio líquido utilizando planilha do banco de dados;
- e) Retirar as amostras usando EPIs específicos para esta atividade;
- f) Imediatamente após a retirada do criotubo, este deve ser imerso parcialmente em banho-maria a 37° C, por 5 minutos para completo descongelamento;

- g) Levar os criotubos descongelados até a cabine de segurança biológica e proceder com a avaliação da cultura criopreservada;
- h) Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, ou sorológica estéril, retira-se uma gota (10 μ L) do conteúdo do tubo de criogenia e coloca-se sobre uma lâmina limpa e seca para avaliação da amostra no microscópio óptico binocular;
- i) Deve ser observada a viabilidade e homogeneidade da amostra para manutenção em cultura;
- j) Cerca de 100-200 μ L do conteúdo do tubo de criogenia deve ser transferido para um tubo contendo meio NNN + 1ml de meio Schneider's;
- k) Os tubos contendo as amostras retiradas dos criotubos devem ser acondicionados em estufa incubadora BOD a 25° C;
- l) Deve-se observar periodicamente as culturas para avaliar a viabilidade celular. Este procedimento deve ser realizado em período não inferior a 3 dias e não superior a 15 dias, até que as culturas estejam com o crescimento ideal para que sejam realizados os repiques semanais;
- m) Caso a amostra descongelada não apresente viabilidade celular em um período não superior a 30 dias, esta deve ser descartada e um novo tubo deve ser retirado do criobanco, seguindo as instruções anteriormente descritas.

REGISTRO DO ENSAIO

- a) O responsável pelo descongelamento das amostras deve rotular, com caneta piloto os tubos contendo NNN nos quais foram inseridas as amostras retiradas do nitrogênio líquido com as seguintes informações:
 - código ou identificação da amostra
 - data do procedimento
- b) O responsável pelo descongelamento deve registrar a posição de retirada dos criotubos no botijão de nitrogênio e inserção na estufa de BOD no formulário de acompanhamento das amostras e controle de preservação.

ANEXO D – PROCESSAMENTO E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS

**INSTITUTO DE DOENÇAS TROPICAIS NATAN PORTELLA
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM LEISHMANIOSES- LABLEISH
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)****PROCESSAMENTO E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS****Sumário:**

- 1.Objetivo
- 2.Siglas
- 3.Responsabilidades
- 3.1. Profissional responsável
- 4.Procedimentos
- 4.1 Material Necessário para a realização:
- 4.2 Separação das amostras
- 4.3 EPIs
- 5.Precuções de segurança
- 6.Referências Bibliográficas

1.Objetivo

Este documento visa descrever o protocolo para o processamento e acondicionamento das amostras no laboratório.

2. Siglas

IDTNP – Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella
LABLEISH - Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses
POP – Procedimento Operacional Padrão
EPIs – Equipamento de Proteção Individual

3.Responsabilidades

- 3.1. Profissional responsável:
 - Técnico devidamente treinado e autorizado pelo LABLEISH.

4.Procedimentos

- 4.1. Material necessário para realização:
 - Centrifuga
 - Eppendorf
 - Etiquetas
 - Pincel permanente
 - Pipetas automáticas
 - Estante para eppendorfs
 - Ponteiras de 1000 µl
 - Caixas de papelão de cem em cem

- 4.2 Separação das amostras:

- Organizar antecipadamente todo o material que irá ser utilizado e na cabine de segurança realizar os procedimentos a seguir:

- a) Retirar uma alíquota de 1 mL de sangue total com anticoagulante;
- b) Transferir a alíquota para um eppendorf identificado e etiquetado com o código, iniciais do nome do paciente e qual o tipo da amostra;
- c) Centrifugar o sangue total do tubo com anticoagulante para a obtenção do plasma no período de 5 a 15 min na velocidade de 2.000 rpm;
- d) Retirar uma alíquota de 1 mL do plasma e transferir para um tubo eppendorf identificado e etiquetado com o código, iniciais do nome do paciente e qual o tipo de amostra;
- e) Centrifugar o sangue total do tubo sem anticoagulante no período de 5 a 15 min na velocidade de 2.000 rpm para a obtenção do soro;
- f) Retirar uma alíquota de 1 mL de soro e transferir para um tubo eppendorf identificado e etiquetado com o código, iniciais do nome do paciente e qual o tipo de amostra;
- g) Colocar as amostras ordenadas nas caixas de cem em cem separadas por tipo (sangue, soro e plasma);
- h) Acondicionar as caixas em um refrigerador a -20°C .

4.3 EPIs

- Luvas descartáveis
- Jaleco de mangas compridas
- Sapatos fechados

5. Precauções de segurança

Manipule com precaução as amostras biológicas, fazendo uso dos devidos equipamentos de segurança, uma vez que trata-se de amostras retiradas de pacientes com doenças infecciosas.

6. Referências Bibliográficas

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (47. : 2013 : São Paulo) Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) : coleta e preparo da amostra biológica. – Barueri, SP: Manole: Minha Editora, 2014.