



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Avaliação da prevalência de infecção por *Leishmania infantum* em pacientes  
submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas**

**Rodolfo Daniel de Almeida Soares**

**Natal/RN**

**2021**

**Rodolfo Daniel de Almeida Soares**

**Avaliação da prevalência de infecção por *Leishmania infantum* em pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Selma Maria Bezerra Jerônimo

**Natal/RN**

**2021**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Soares, Rodolfo Daniel de Almeida.

Avaliação da prevalência de infecção por *Leishmania infantum* em pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas / Rodolfo Daniel de Almeida Soares. - 2021. 70f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Natal, RN, 2021. Orientadora: Selma Maria Bezerra Jerônimo.

1. Leishmaniose visceral - Dissertação. 2. Transplante - Dissertação. 3. Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas - Dissertação. 4. *Leishmania* - Dissertação. 5. Anticorpo - Dissertação. I. Jerônimo, Selma Maria Bezerra. II. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 616.993.161

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde  
Prof. Dr. Eryvaldo Socrates Tabosa do Egito

**Rodolfo Daniel de Almeida Soares**

**Avaliação da prevalência de infecção por *Leishmania infantum* em pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas**

**Aprovada em \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_**

**Banca examinadora:**

Presidente da Banca: Selma Maria Bezerra Jeronimo

Membros da Banca:

Profa. Dra. Eliana Lúcia Tomaz do Nascimento

Prof. Dr. Fernando Barroso Duarte

## DEDICATÓRIA

Aos pacientes

Os grandes vencedores na luta pela vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À equipe de transplante do Hospital Rio Grande pela parceria diária, construída com o compartilhamento de conhecimentos e de esforços em benefício da saúde dos nossos pacientes.

À equipe da Unidade Transfusional do HUOL que não se deixa abater diante das dificuldades inerentes ao serviço público, compensando o presente momento financeiro desafiador com esmero no cuidado dos enfermos que acorrem àquele serviço.

A Carol Aguiar e Glória Monteiro por dedicarem tempo e expertise (e paciência) no apoio irrestrito para conclusão deste estudo.

À professora Selma pesquisadora genial e profissional inspiradora, que dividiu o seu tempo e a sua experiência comigo, tornando possível a existência do trabalho ora concluído.

À minha esposa, que compreende as minhas ausências e se orgulha das nossas conquistas.

## RESUMO

O Número de Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) vem crescendo em áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil e outros países. Além disso, o número de casos de LV vem aumentando em pacientes imunossuprimidos, tendendo a se apresentar com uma taxa de caso-fatalidade mais alta. Nós revisamos os registros de pacientes transplantados em uma área altamente endêmica para LV no Nordeste Brasileiro e realizamos um estudo de corte para determinar a taxa de infecção por *Leishmania infantum*. Dentre os 337 pacientes transplantados no estado do Rio Grande do Norte, entre 2009 e 2016, não havia nenhum caso LV. Nós estudamos 73 (21,6%) indivíduos que estavam com mais de 02 anos de TCTH. Doze dos 73 (16,4%) tiveram anticorpos anti-*Leishmania* positivos e 11 de 66 (16,6%) foram positivos quando usamos o ensaio qPCR para *Leishmania*. Depois de um tempo de seguimento médio de 16 meses, nenhum progrediu para LV e eles se tornaram negativos para anticorpos anti-*Leishmania*. Nós concluímos que pacientes transplantados residentes em áreas endêmicas para LV podem frequentemente se infectarem com *Leishmania*. Apesar de nenhum ter progredido para forma ativa da doença, seria prudente seguir esses indivíduos uma vez que há indícios de persistência da *Leishmania* e risco eventual de LV devido à terapia de tratamento pós-transplante.

Palavras Chaves: Leishmaniose visceral; Transplante; Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas; *Leishmania*; Anticorpo



## ABSTRACT

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) procedures are increasing in endemic areas for human visceral leishmaniasis (VL) in Brazil and elsewhere. In addition, the number of VL cases is increasing in immunosuppressed individuals and these cases tend to present a higher case-fatality rate. We reviewed the registry of HSCT subjects in a highly VL endemic area in Northeast Brazil and performed a cross sectional study to determine their rate of *Leishmania infantum* infection. Among the 337 subjects transplanted in the state of Rio Grande do Norte, between 2009 and 2016, there were no prior VL cases associated with the transplant. We studied 73 (21.6%) individuals who were over 2 years after HSCT. Twelve of 73 (16.4%) had positive anti-*Leishmania* antibodies and 11 of 66 (16.6%) tested positive when using *Leishmania* qPCR assay. After a median follow up of 16 months, none progressed to VL and they became anti-*Leishmania* antibody negative. We conclude that transplanted subjects residing in VL endemic areas can frequently become infected with *Leishmania*. Although none progressed to active disease, it would be wise to follow up those individuals since there is a possibility of *Leishmania* persistence and eventual risk of VL due to the post-transplant management therapy.

Keywords: Visceral Leishmaniasis; Transplant; Hematopoietic Stem Cell Transplantation *Leishmania*; Antibody

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>TCTH</b>	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
<b>Auto-TCTH</b>	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas Autólogo
<b>Alo-TCTH</b>	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas Alogênico
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>DECH</b>	Doença do Enxerto contra Hospedeiro
<b>Th1</b>	Células T auxiliares do tipo 1
<b>Th2</b>	Células T auxiliares do tipo 2
<b>CD4+</b>	Linfócitos T que expressão CD4
<b>CD8+</b>	Linfócitos T que expressão CD8
<b>ELISA</b>	Exame de imunoabsorbância ligada a enzima
<b>kDNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico do cinetoplasto
<b>DA</b>	Doador aparentado
<b>NAP</b>	Doador não-aparentado
<b>CU</b>	Cordão umbilical
<b>Haplo</b>	Doador haploidêntico
<b>Auto</b>	Doador autólogo
<b>MM</b>	Mieloma Múltiplo
<b>LMA</b>	Leucemia Mielóide Aguda
<b>LNH</b>	Linfoma não-Hodgkin
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>CTLA4</b>	Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico
<b>PD1</b>	Receptor de morte programada 1

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de inclusão no estudo

*Figure 1(article)* – Resultado de sorologia anti-*Leishmania*

*Supporting Figure 1 (article)* – Fluxograma de inclusão

Figura 2 – Painel de ativação de linfócitos T

Figura 3 – Expressão de CD57 em linfócitos T.

Figura 4 – Painel de anergia de linfócitos T com PD-1.

Figura 5 – Expressão de CTLA4 em linfócitos T.

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Painel de anticorpos para determinação de ativação, senescência, anergia, exaustão e regulação

*Table 1 (article)* - Características dos pacientes incluídos

*Table 2 (article)* – Variação nas características epidemiológicas pré e pós-TCTH

*Table 3 (article)* - Número de casos positivos para sorologia e PCR

*Table S1 (article)* - Comparação entre pacientes incluídos para avaliação clínica e os elegíveis, mas não incluídos.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS .....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos .....	15
3. JUSTIFICATIVA.....	16
4. MÉTODOS .....	17
4.1. Análise do banco de dados.....	17
4.2. Seleção de pacientes para estudos de corte e seguimento .....	17
4.3. Detecção de infecção pela <i>Leishmania infantum</i> .....	18
4.4. Reconstituição Imune .....	19
4.5. Resposta ao estímulo com antígenos de <i>Leishmania</i> .....	19
4.6. Análise estatística.....	20
4.7. Infecção Assintomática por <i>Leishmania</i> em indivíduos transplantados e saudáveis 21	
4.8. Considerações Éticas .....	22
5. ARTIGOS PRODUZIDOS .....	23
6. DISCUSSÃO .....	52
7. CONCLUSÕES.....	55
8. REFERÊNCIAS .....	56
9. APÊNDICE .....	63
9.1. Apêndice 1 - Ficha de avaliação clínica e epidemiológica.....	63
10.1. Apêndice 2 - Ativação e senescência linfocitária .....	65

## 1. INTRODUÇÃO

O Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) é um processo que visa reconstituir a hematopoiese após a aplicação de quimioterapia e/ou radioterapia. Sua realização está indicada em situações em que se almeja utilizar doses altas de tratamento mielotóxico para o controle de neoplasias; ou quando há necessidade de substituir a própria célula hematopoiética doente (nos casos de hemoglobinopatias, por exemplo)(1). A célula tronco hematopoiética pode ser proveniente do próprio paciente, sendo chamado Autólogo (Auto-TCTH); ou de outra pessoa, no Transplante Alogênico (Alo-TCTH).

Nas duas formas de transplante, o paciente permanece por um tempo médio de 14 a 28 dias em aplasia medular, ocasião em que está mais imunossuprimido devido a neutropenia e linfopenia intensa. Nesse período, maior preocupação está nas infecções bacterianas e fúngicas. É necessária implementação de protocolo de cuidados em pacientes neutropênicos, com tratamento precoce de infecções e utilização de antimicrobianos profiláticos(2).

Após a enxertia, detectada pela permanência de 02 dias consecutivos com contagem de Neutrófilos maior que 500/mcL, o risco de infecção bacteriana reduz substancialmente. Mas devido à latência para normalização das contagens de linfócitos, a imunossupressão persiste por mais tempo. Esse quadro é mais intenso no Alo-TCTH devido à utilização de medicações imunossupressoras, especialmente a ciclosporina. Mas mesmo no Auto-TCTH, a completa recuperação das contagens dos linfócitos T CD4+ pode levar cerca de 02 anos (3). Além da redução numérica, há também estreitamento da diversidade dos Receptores de Células T, o que contribui para imunossupressão desse período(4).

O número de linfócitos B costuma se reestabelecer mais rapidamente que os linfócitos T, demorando cerca de 01 ano(5). No entanto, a destruição dos linfócitos de memória pela quimioterapia e/ou radioterapia pré-transplante leva ao desaparecimento de imunoglobulinas específicas contra patógenos, as quais só voltarão a atingir níveis protetores após reexposição ou vacinação(6).

No Alo-TCTH especificamente, a ocorrência da Doença do Enxerto contra Hospedeiro (DECH), leva a um estado de imunossupressão ainda mais intenso e prolongado. Nela, os linfócitos provenientes do doador orquestram uma

agressão imune aos tecidos do receptor. Como consequência, os mecanismos contra-regulatórios promovem uma redução de resposta a outros antígenos, incluindo aqueles provenientes de micro-organismos patogênicos(7).

Após cerca de 02 anos em pacientes sem DECH (demorando um pouco mais naqueles com DECH), com a normalização das contagens e função dos linfócitos e finalização do esquema vacinal, o paciente geralmente evolui com redução progressiva no número de infecções secundárias e pode usufruir de uma vida praticamente normal, sem anti-microbianos profiláticos nem imunossupressores. Até lá, entretanto, todos esses mecanismos citados acima contribuem de forma cumulativa, tornando o TCTH a condição clínica com maior grau de imunossupressão conhecida. O manejo de profilaxias, vacinação e tratamento precoce de infecções são essenciais na condução desses pacientes.

Desde o início da quimioterapia, recomenda-se administração de antifúngicos, mais frequentemente o Fluconazol(2), e de profilaxia contra o *Pneumocysti Jiroveci*, com Sulfametoxazol e Trimetoprim(8). Para infecções por Herpesvírus 1 e 2 e Varicela-zoster, está indicado Aciclovir(9). Quanto a infecções tropicais, existe menos consenso sobre a necessidade de profilaxia específica (8). Todavia, existe grande preocupação com a ocorrência de Leishmaniose Visceral (LV) nesses pacientes(10,11), especialmente por que o número de transplantes em regiões endêmicas vem aumentando(12,13).

A LV é uma doença sistêmica crônica causada por protozoários do gênero *Leishmania*. É endêmica nas regiões tropicais da Ásia, leste da África, Bacia Mediterrânea e América do Sul(14). No Brasil, ocorre principalmente no Nordeste(15), e está associada a pobreza(16), desnutrição(17) e más condições de moradia(18).

A transmissão é feita por mosquitos do gênero *Phlebotomus* na Ásia e Mediterrâneo e pelo gênero *Lutzomyia* na América do Sul(19). A distribuição geográfica do vetor justifica parte da epidemiologia da doença. No entanto, quando se avalia a população acometida dentro da área endêmica, verifica-se que a maior parte das pessoas infectadas são capazes de gerar uma resposta imune e resolver a infecção espontaneamente(20). Nesses casos, a detecção da infecção se faz apenas pela positividade teste de intradermorreação a antígenos de *Leishmania* (teste de Montenegro) ou pela positividade sorológica(21).

Além da infecção assintomática, uma parcela de pacientes expostos pode desenvolver um conjunto de sintomas inespecíficos, em uma forma

classificada como oligossintomática. Já na forma clássica e sintomática da LV, conhecida como Calazar, a doença se manifesta como uma hepatoesplenomegalia febril, associada muitas vezes com sintomas respiratórios e digestivos(17). O hemograma revela pancitopenia, e o estado de ativação imune se reflete em produção de anticorpos policlonais, detectados com aumento da dosagem de gamaglobulinas(22).

Diversos fatores estão associados ao desenvolvimento das formas sintomáticas após infecção, desde virulência da cepa, até o perfil genético do paciente(23), passando por interações complexas entre o patógeno e a resposta imune. Em modelos animais, está bem documentado que o controle da doença se inicia com a secreção de interleucina-12 pelas células dendríticas, seguido pela produção de Interferon-gama pelas células *Natural Killers*. O Interferon-gama, agindo sobre os linfócitos TCD4+, promove um padrão de resposta do tipo Th1, capaz de estimular a produção de óxido nítrico e formas reativas de oxigênio nos lisossomos dos macrófagos, que em última análise são os responsáveis pela destruição das formas amastigotas de leishmania presentes nos tecidos(22).

Interferências nesse processo podem levar a um ambiente permissivo à proliferação da leishmania, culminando com o adoecimento. Isso é muito bem exemplificado em pacientes coinfetados com o vírus HIV. Neles, a depleção de linfócitos CD4+ está associada a um estado de hiperativação de resposta do tipo Th2. Nesse caso, diferentemente do encontrado no Th1, a infecção pela leishmania desencadeia a secreção de outro conjunto de citocinas, incluindo grande quantidade de interleucinas 4 e 10, que direcionam a resposta à produção de anticorpos não protetores(24). Como resultado, pacientes com HIV tem formas agressivas e reincidentes de calazar.

É natural extrapolar esses achados do HIV para outras formas de imunossupressão em que encontramos redução numérica ou funcional de linfócitos T decorrente do uso de corticosteroides, imunossupressores ou quimioterapia. Os pacientes submetidos a TCTH em especial, com a já citada intensa imunossupressão multifatorial, constituem um grupo de altíssimo risco teórico ao adoecimento por *Leishmania*.

Apesar disso, relativamente poucos casos de Calazar no contexto do TCTH foram publicados até o momento. Inexistem estudos epidemiológicos no assunto. Todas as publicações disponíveis são revisões(25) ou relatos de



casos(10,26,35,36,27–34). Totalizando 14 pacientes, é um número surpreendentemente pequeno quando se considera os mais de 65 mil transplantes realizados anualmente no mundo(12). Além disso, quase todos os relatos são de países europeus. Apenas 01 publicação foi de um centro brasileiro(31), onde a incidência de Calazar na população geral é 04 vezes maior que na bacia mediterrânea(14), sugerindo fortemente a ocorrência de subnotificação.

Por outro lado, pacientes submetidos a TCTH em áreas endêmicas são submetidos a uma grande gama de modificações no estilo de vida(37)(38). Recomendações pensadas para evitar outras complicações, como reduzir exposição ao sol usando roupas cobertas, evitar trabalhos ao ar livre e melhorar as condições de moradia, podem proteger do contato com o mosquito vetor.

Também, as formas de interação entre a leishmania e a resposta imune de receptores de TCTH nunca foi estudado. O padrão de recuperação imune do paciente transplantado está sujeito a muitos fatores confundidores, como DECH, neoplasia concomitante e outras infecções oportunistas. Soma-se a isso o fato do TCTH ser um procedimento relativamente novo(39). Disso resulta que a imunidade pós-TCTH é ainda uma área de estudo incipiente, mas extremamente promissora. Assim, é possível que, mesmo imunossuprimido e susceptível a uma grande variedade de infecções, o paciente submetido a TCTH consiga montar uma resposta frente à infecção por *Leishmania* semelhante ao que ocorre em indivíduos imunocompetentes.

Neste estudo, analisamos os registros hospitalares de um serviço de TCTH sediado em uma região altamente endêmica para LV visando responder a primeira das nossas hipóteses, de subnotificação. Alguns dos pacientes foram selecionados e seguidos, permitindo quantificar as modificações nos hábitos de vida (segunda hipótese) e observar a possibilidade de resolução espontânea da infecção assintomática (terceira hipótese). Por fim, utilizando uma técnica desenvolvida em pacientes imunocompetentes, avaliamos o padrão de resposta dos linfócitos T dos pacientes transplantados frente aos antígenos de *Leishmania*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Entender os efeitos da exposição de pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas a um ambiente de grande endemicidade e com transmissão ativa de *Leishmania infantum*.

### 2.2. Objetivos Específicos

Determinar a incidência de formas sintomáticas de leishmaniose visceral em pacientes transplantado em área endêmica.

Investigar se pacientes transplantados em área endêmica modificam aspectos epidemiológicos que podem os tornar menos expostos ao mosquito vetor.

Buscar casos assintomáticos ou oligossintomáticos de leishmaniose visceral.

Avaliar prospectivamente a taxa de adoecimento em pacientes assintomáticos.

Estudar o padrão de resposta imune dos pacientes transplantados quando submetidos a estímulo com antígenos de *Leishmania* e compará-lo com pacientes imunocompetentes.

### 3. JUSTIFICATIVA

As infecções oportunistas figuram entre as principais causas de óbito em pacientes submetidos a TCTH. A atividade de pesquisa nessa área, visando diagnóstico mais precoce e tratamento mais efetivo, é intensa. Entretanto, esses estudos se concentram em países desenvolvidos, com incidência de patógenos que não devem refletir com propriedade o que ocorre em países em desenvolvimento. Mesmo quando entidades brasileiras publicam recomendações de manejo para esses pacientes, usam como parâmetros os estudos realizados fora do país. A LV, por se concentrar em países tropicais com pouca produção científica e figurar entre as doenças negligenciadas, pode estar sendo subestimada. Uma evidência disso é a ausência de estudos epidemiológicos sobre esse assunto. Dessa forma, pessoas transplantadas em área endêmica podem estar susceptíveis ou mesmo indo a óbito em decorrência do subdiagnóstico.

O desenvolvimento de pesquisas em doenças mais prevalentes em regiões tropicais permite a mensuração do tamanho do problema e dão fundamentação para medidas preventivas que possam se fazer necessárias. Além disso, dada a complexidade da resposta imune do paciente transplantado e dos mecanismos patogênicos da *Leishmania*, a conhecimento adquirido com o estudo dessa associação poderá trazer informações relevantes para outros tipos de infecções oportunistas.

## **4. MÉTODOS**

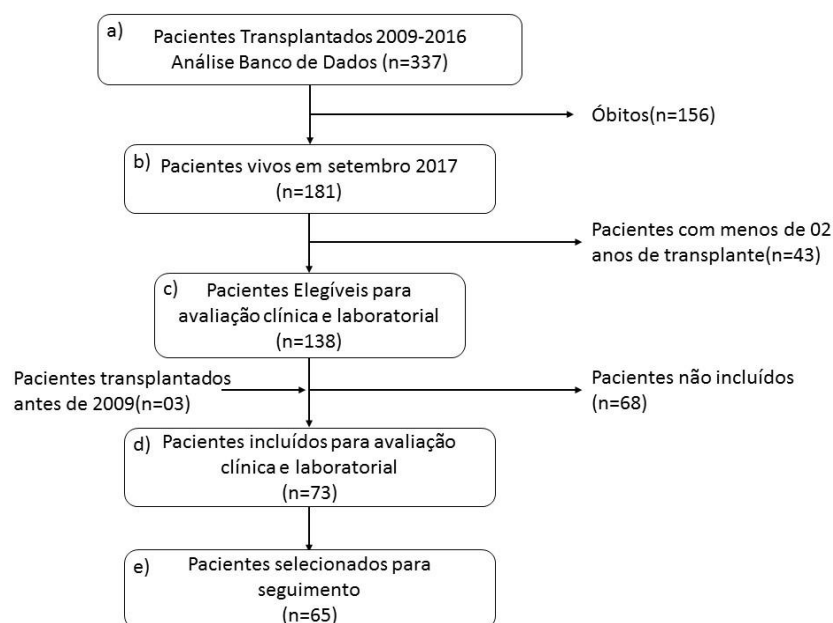
### **4.1. Análise do banco de dados**

O estudo foi conduzido com pacientes transplantados na cidade de Natal, capital do estado do Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil), uma área altamente endêmica para Leishmaniose Visceral (LV)(40). O único centro de transplantes de células tronco do estado iniciou atividades em 2004 e vem em crescimento constante desde então. Os registros de transplantes são mantidos por recomendação do Ministério da Saúde e contém informações como data de nascimento, sexo, procedência, data do transplante, doença de base, tipo de doador e data do óbito. Além disso, o diagnóstico de LV é de notificação compulsória no Brasil desde 1992. Informações sobre comorbidades, como câncer, ou co-infecções também são relatados e estão disponíveis no banco de dados do Ministério da Saúde.

### **4.2. Seleção de pacientes para estudos de corte e seguimento**

Nós também realizamos um estudo de corte com pacientes transplantados após o ano de 2009, excluindo indivíduos com menos de 02 anos desde o transplante, levando a uma população de N=138 pacientes vivos do total de 337 na população alvo. Utilizando amostra aleatória simples, pelo critério de retorno ao sistema, incluímos uma amostra final de 70 indivíduos transplantados. Em adição, nós incluímos 03 outros pacientes transplantados antes de 2009.

Os pacientes foram convidados a participar do estudo quanto retornavam às suas consultas de seguimento pós-transplante. Após consentirem, eram entrevistados sobre seu quadro clínico, condições de moradia e hábitos de vida atuais e pré-TMO. Amostras de sangue foram coletadas. Dados técnicos sobre o TCTH, como doença de base e tipo de doador, foram captados do prontuário do paciente. Aqueles que completaram 06 meses após a inclusão no estudo foram reavaliados. O esquema de seleção de pacientes do banco de dados, estudo de corte e seguimento estão na Figura 1.



**Figura 1 – Fluxograma de Inclusão.** Foram retrospectivamente avaliados dados dos 337 pacientes transplantados entre 2009 e 2016 para formas sintomáticas de LV(a). Cento e cinquenta e seis deles faleceram, resultando em 181 paciente vivos (b). Como 43 pacientes foram transplantados há menos de 02 anos da avaliação, restaram 138 elegíveis (c). Selecionamos 70 desses pacientes para estudo de corte, e adicionamos 03 pacientes transplantados antes de 2009 (d). Sessenta e cinco desses pacientes foram seguidos por uma mediana de 15 meses (e).

#### 4.3. Detecção de infecção pela *Leishmania infantum*

Anticorpos anti-*Leishmania* foram rastreados por ELISA usando duas fontes de antígenos previamente descritas(41). Na primeira, os antígenos foram preparados de um lisado de *Leishmania infantum* isolado de um paciente com LV de Natal, previamente tipado em um laboratório de referência para a Organização Mundial de Saúde (Dra. Elisa Cupolillo, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil). No outro caso, usamos antígeno K39 recombinante gentilmente cedido pela *Infectious Disease Research Institute*, (IDRI, Seattle, WA, EUA). Cada amostra de soro foi testada em duplicatas. O  $A_{405}$  foi determinado usando o leitor de placas Asys Hitech GMBH (Eugendorf, Austria). O ponto de corte utilizado foi a média mais 03 desvios padrões da absorbância de controles negativos. Os soros dos controles negativos foram obtidos de residentes em áreas não endêmica para Leishmaniose visceral ou cutânea.

O DNA dos pacientes foi extraído do sangue total, e o DNA controle obtido de indivíduos de uma região não endêmica(42). O DNA do parasita foi amplificado por reação de polimerase em cadeia quantitativa da região conservada de multicópia dos mini círculos de DNA do cinetoplasto da *Leishmania infantum* (kDNA)(15). Reações duplicadas foram realizadas no termociclador ABI 7500 (Waltham, MA, EUA). O número de parasitas de cada amostra foi calculado segundo uma curva padrão gerada de DNA extraído de um número conhecido de promastigotas *L. infantum*.

#### **4.4. Reconstituição Imune**

A quantificação de linfócitos TCD4+ e TCD8+ foi estimada com reagente BD Tritest™ e analisado no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience, EUA). A detecção de valores baixos de linfócitos foi baseada na referência disponibilizada no kit.

O diagnóstico e graduação da Doença do Enxerto contra Hospedeiro (DECH) foi realizada de acordo com as recomendações do *National Institute of Health*(43). Para fins de simplificação, Mieloma Múltiplo ativo foi considerado apenas em pacientes com citopenias ou outras manifestações clínicas compatíveis com a doença.

#### **4.5. Resposta ao estímulo com antígenos de *Leishmania***

Foram coletados 8 ml de sangue de cada participante em tubos contendo heparina como anticoagulante. O sangue foi dividido em 4 partes de 2mL cada, e incubado por 18h com Fitohemaglutinina (PHA), Antígeno Solúvel de *Leishmania* (SLA), toxina tetânica e meio (controle). O ambiente de incubação foi controlado para permanecer a 37°C, com CO<sub>2</sub> a 05%.

Após período de incubação, foi adicionado 6mL de tampão de lise de células vermelhas em cada alíquota e mantido por 20 min a 4°C. Seguiu-se centrifugação a 2851 x g por 15min a 10°C. A etapa de lise de células vermelhas foi realizada duas vezes para a obtenção das células brancas. O pool de células brancas foi lavado com 10mL de PBS-Azida 0,1% centrifugado a 754 x g por 10 min a 4°C. O pellet de células brancas foi ressuspenso em 400mcL de PBS-BSA (0,5%). A suspensão celular foi dividida em 100mcL por tubo cônico de polipropileno de 5 ml (BD) e incubado com anticorpos monoclonais segundo desenho experimental mostrado no quadro 1. Após a incubação por 30 minutos a 4°C, as células foram lavadas em PBS por centrifugação (754 xg, 10 minutos

a 4°C) e ressuspensas em PBS contendo 1% de formaldeído (Sigma). As células então foram fixadas por 15 minutos em temperatura ambiente, e após a fixação, foram lavadas em PBS por centrifugação (754 x g, 10 minutos a 4°C). Por fim, o pellet contendo as células marcadas e fixadas foram ressuspensas em 200mL de PBS e armazenadas a 4°C até o momento da aquisição em citômetro de fluxo BD Canto II.

Os resultados dos pacientes pós-TCTH foram comparados com controles saudáveis e com pacientes em recuperação de Leishmaniose visceral.

**Quadro 1 – Painel de anticorpos para determinação de ativação, senescência, anergia e exaustão**

	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
<b>Ativação</b>	<b>CD38</b>	<b>HLA-DR</b>		<b>CD4</b>	<b>CD3</b>	<b>CD8</b>
<b>Senescência, anergia e exaustão</b>	<b>CD57</b>	<b>CTLA4</b>	<b>PD1</b>	<b>CD4</b>	<b>CD3</b>	<b>CD8</b>

FITC = Isocianato de fluoroceína; PE = Ficoeritrina; APC = Alofocianina; Cy = Cianina

#### 4.6. Análise estatística

O erro amostral foi determinado *a posteriori*, estimando a taxa de infecção por *Leishmania infantum* na população de estudo para um intervalo de 100(1- $\alpha$ )% usando a fórmula:

$$\hat{B} = Z_{\alpha} \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n} \left(1 - \frac{n}{N}\right)} \quad (1)$$

Onde  $\hat{p}$  é a proporção de indivíduos infectados por *Leishmania* na amostra e  $Z_{\alpha}$  é o percentual correspondente da curva normal padrão. De acordo com essa fórmula (1), com 90% de certeza, o erro padrão estimado da amostra desse estudo com  $\hat{p} = 12,4\%$  não foi maior que 5%, denotando um poder adequado do esquema de amostragem.

O teste-t foi utilizado para amostras independentes ou dependentes de acordo com o caso. A comparação dos pesos corporais pré e pós-transplante das crianças e adolescentes com menos de 18 anos (04 pacientes) foram excluídas da análise por não estar necessariamente relacionada ao status nutricional da mesma forma que no adulto. Comparações de distribuições ou proporções entre pré e pós-transplante e a associação entre a sorologia para *Leishmania* e qPCR foram avaliadas usando teste Qui-quadrado de McNemar para dados pareados comparando a discordância do primeiro tipo,  $n_A$ , com o total

de discordância,  $n_D$ , em cada teste. A hipótese de proporções ou performances iguais foi rejeitada quando  $P_r(X^2 > X_{1,1-\alpha}^2) < \alpha$ , em um nível de significância de  $\alpha=5\%$ , onde:

$$X^2 = \frac{\left(\left|n_A - \frac{n_D}{2}\right| - \frac{1}{2}\right)^2}{\left(\frac{n_D}{4}\right)} \quad (2)$$

Para o teste sorológico de *Leishmania*, a taxa de concordância,  $r_C = 1 - n_D/n$ , também foi calculada. A comparação do tempo de seguimento entre os indivíduos incluídos ou não foi realizada usando o teste de Mann-Whitney para grupos independentes devido à ausência de normalidade. Diferenças entre a renda familiar foram calculadas com o teste do sinal.

#### 4.7. Infecção Assintomática por *Leishmania* em indivíduos transplantados e saudáveis

Comparamos os dados previamente publicados sobre infecção assintomática por *Leishmania* em nível comunitário(15) com os coletados neste estudo. A hipótese principal testada foi que havia uma baixa incidência de formas assintomáticas de leishmaniose em pacientes transplantados de medula quando comparado aos indivíduos residindo na mesma área geográfica(15). No estudo anterior, a seleção de moradias e seus indivíduos na comunidade estudada foi baseada em uma aleatorização de domicílios levando em conta uma distância de 300m, que é o alcance estimado do mosquito vetor. A hipótese estatística  $H_0: p_1 = p_2$  versus  $H_1: p_1 < p_2$  foi avaliada pelo teste-t unicaudal de grupos independentes para o qual a estatística com correção para populações finitas é dada por:

$$t = \frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\sqrt{\left[\frac{\hat{p}_1(1-\hat{p}_1)}{n_1}\right]\left(1 - \frac{n_1}{N_1}\right) + \left[\frac{\hat{p}_2(1-\hat{p}_2)}{n_2}\right]\left(1 - \frac{n_2}{N_2}\right)}} \quad (3)$$

Onde  $\hat{p}_1$  e  $\hat{p}_2$  são as taxas estimadas nas amostras dos 02 estudos,  $n_1$  e  $n_2$  o tamanho de suas amostras e  $N_1$  e  $N_2$  o tamanhos de suas populações, respectivamente.  $H_0$  é rejeitada ao nível de  $\alpha$  se  $P_r(t < X_{n_1+n_2-2,1-\alpha}^2) < \alpha$ .

Todas as decisões feitas nos testes estatísticos foram baseadas em um nível de significância de 05% utilizando software SPSS, versão 20 (IBM, USA).



#### **4.8. Considerações Éticas**

O protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da UFRN (CAAE 12584513.1.0000.5537). Todos indivíduos incluídos no estudo, ou seus representantes legais, assinaram termo de consentimento.

## 5. ARTIGOS PRODUZIDOS

O Artigo "*Leishmania infantum* infection in Hematopoietic Stem Cell Transplanted Patients in a Visceral Leishmaniasis Endemic Area in Brazil" foi aceito para publicação no periódico Plos Neglected Tropical Diseases, que possui fator de impacto 3,885 e Qualis A2 da CAPES para a área Medicina II.

1 ***Leishmania infantum* infection in Hematopoietic Stem Cell Transplanted**  
2 **Patients in a Visceral Leishmaniasis Endemic Area in Brazil**

3

4 Rodolfo Daniel de Almeida Soares<sup>1</sup>, Gloria Regina de Gois Monteiro<sup>2</sup>, Carolina de  
5 Oliveira Mendes-Aguiar<sup>2</sup>, Manuela Pinto Tiburcio<sup>1</sup>, Elyneide Natália Leite Rodrigues<sup>3</sup>,  
6 Selma Maria Bezerra Jerônimo<sup>2,4\*</sup>

7

8 <sup>1</sup>Hospital Universitário Onofre Lopes, Universidade Federal do Rio Grande do Norte,  
9 Natal, RN, Brazil

10 <sup>2</sup>Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte, Universidade Federal do Rio  
11 Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

12 <sup>3</sup>Unidade de Transplante de Medula Óssea, Hospital Rio Grande, Natal, RN, Brazil

13 <sup>4</sup>Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Doenças Tropicais, Natal, RN

14

15 \*Corresponding Author:

16 Selma M.B. Jeronimo

17 Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte

18 Universidade Federal do Rio Grande do Norte

19 e-mail: [smbj@cb.ufrn.br](mailto:smbj@cb.ufrn.br)

20

## 21 Abstract

22 Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) procedures are increasing in endemic  
23 areas for human visceral leishmaniasis (VL) in Brazil and elsewhere. In addition, the  
24 number of VL cases is increasing in immunosuppressed individuals and these cases  
25 tend to present a higher case-fatality rate. We reviewed the registry of HSCT subjects  
26 in a highly VL endemic area in Northeast Brazil and performed a cross sectional study  
27 to determine their rate of *Leishmania infantum* infection. Among the 337 subjects  
28 transplanted in the state of Rio Grande do Norte, between 2009 and 2016, there were  
29 no prior VL cases associated with the transplant. We studied 73 (21.6%) individuals  
30 who were over 2 years after HSCT. Twelve of 73 (16.4%) had positive anti-*Leishmania*  
31 antibodies and 11 of 66 (16.6%) tested positive when using *Leishmania* qPCR assay.  
32 After a median follow up of 16 months, none progressed to VL and they became anti-  
33 *Leishmania* antibody negative. We conclude that transplanted subjects residing in VL  
34 endemic areas can frequently become infected with *Leishmania*. Although none  
35 progressed to active disease, it would be wise to follow up those individuals since  
36 there is a risk of *Leishmania* persistence and eventual risk of VL due to the post-  
37 transplant management therapy.

38

## 39 Author Summary

40           Visceral leishmaniasis (VL), also known as kala-azar, is caused by species of  
41 the *Leishmania donovani* complex. The pathogen is mostly transmitted by sand fly  
42 bites, but also by other routes. Poverty is usually associated with increased risk of  
43 Leishmania infection and VL development. Recently people with immune disorders,  
44 especially those with HIV, are at greater risk of developing VL. Hematopoietic Stem  
45 Cell Transplantation is an aggressive treatment recommended for hematological  
46 diseases, such as leukemia. To perform the transplant, a reset of the patient's immune  
47 system is required. Thus, Hematopoietic Stem Cell Transplantation is a condition that  
48 temporarily leads to one of the greatest reductions in the immune response. With the  
49 increase in the number of transplants performed in VL endemic regions, there is a risk  
50 of VL among transplanted individuals. In this study, although 21 of 73 (28.7%)  
51 hematopoietic transplanted patients had signs of *Leishmania* infection, none  
52 developed VL. Although none of the subjects developed symptomatic VL, there is still  
53 a need for further follow up of transplanted individuals residing in endemic area for VL,  
54 since Leishmania can persist for years, and these subjects may maintain some  
55 immunosuppression because of the specific therapy for managing post-transplant  
56 phase.

57

## 58 **Introduction**

59           Visceral leishmaniasis (VL) is a chronic systemic disease mostly occurring in  
60 endemic in regions of Asia, East Africa, the Mediterranean Basin and South America  
61 [1]. The disease is caused by infection of protozoa of the *Leishmania* genus [2]. VL  
62 has been historically associated with malnutrition and lower social income [3–5].  
63 Asymptomatic *Leishmania* infection is high, and only a minority of infected people  
64 develop VL. *Leishmania* is now considered an opportunistic pathogen, especially in  
65 people co-infected with HIV [6–9]. More recently about 10% of the VL cases in Brazil  
66 are HIV-coinfected [10]; but VL has also increased in other settings of  
67 immunosuppression, even in non-tropical countries, such as neoplasms or immediate  
68 transplants [11–14].

69           Most reports of VL in transplanted subjects come from kidney grafts [15], since  
70 this is a procedure more common in VL endemic areas, and few are in the context of  
71 hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) [16]. Those reports are almost  
72 exclusively from Europe [17–25]. Only 1 publication is from South America [26], where  
73 VL incidence in the general population is 4 times greater than in the Mediterranean  
74 basin [1]. In addition, there is a concern of an increased VL risk in subjects using  
75 biologicals such as anti-TNF inhibitors in VL endemic areas of India and Brazil, but  
76 also in other regions such as Mediterranean Europe [18,27].

77           It is known that immunocompetent individuals in areas endemic for VL are  
78 frequently infected by *Leishmania*, [3,28–30] but they evolve with self-resolution, with  
79 infection only being detectable by serological screening, PCR analysis, or by the  
80 Leishmanin skin test also known as the Montenegro test [31,32]. In the past, one in  
81 six *Leishmania* infected children in Brazil developed VL [33], apparently there has  
82 been a decrease in VL development [34], although *Leishmania* transmission still

83 occurs. However, there is evidence that *Leishmania* can persist for years after  
84 infection and subjects can develop VL when there is an eventual loss of immunity [35].  
85 Conversely, transplanted patients undergo a whole range of recommendations  
86 concerning their lifestyle that can result in decreased risk of vector exposure, which in  
87 turn decreases the risk of infection by vector-borne pathogens [36].

88 Organ and cell transplants have increased in Brazil in the last 30 years and  
89 many of subjects residing in VL endemic areas undergo transplant [37,38]. Our  
90 hypothesis was that these transplanted individuals were at lower risk of *Leishmania*  
91 infection due to decreased exposure to sand flies. In this study, we addressed the risk  
92 of *Leishmania* exposure, determined the rate of *Leishmania infantum* infection in a  
93 cross-sectional sample and performed a follow up of the HSCT subjects. We also  
94 evaluated the incidence of symptomatic VL by performing a retrospective analysis of  
95 HSCT patients, considering all subjects who underwent transplant since the  
96 introduction of the program in Natal, Brazil.

## 97 **Methodology**

### 98 **Database Analysis - Population and Sample**

99 This study was conducted in Natal, state of Rio Grande do Norte (Northeastern  
100 Brazil) by studying subjects from a HSCT program. The state of Rio Grande do Norte  
101 is highly endemic for VL [34,39]. The only transplantation unit of the state was opened  
102 in 2004. Transplant records are maintained by the Ministry of Health and contain  
103 information such as date of birth, sex, place of residence, date of transplantation,  
104 underlying disease, type of donor, and date of death. Conversely, VL records are also  
105 maintained by the Ministry of Health since 1992 and information on co-morbidity, such  
106 as cancer, or co-infections in VL cases are also reported and available through the  
107 Ministry of Health database. Inclusion criteria for the HSCT analysis was subjects

108 transplanted in in Rio Grande do Norte state after 2009, yielding a target population of  
109 337 individuals. This target population was studied to determine whether any had  
110 developed VL.

### 111 **Subject Selection for cross sectional and follow up**

112 We also performed a cross sectional study excluding subjects with less than 2  
113 years since transplant, yielding a sample of N = 138 living patients of the 337 target  
114 patient population, from which a simple random sample (SRS), by the return criterion  
115 to the system, resulted in a final sample of 70 transplanted subjects. In addition, we  
116 included 3 other patients transplanted before 2009.

117 Subjects were invited to participate in this study when they came to their  
118 appointments for the transplant follow up. After consenting, they were interviewed  
119 about their clinical status, living conditions, and current and pre-transplant life habits  
120 and a blood sample was collected. Technical data on the transplant procedure, such  
121 as underlying diseases and donor type, were taken from the patients' chart. Patients  
122 completing at least 6 months since enrollment in our study, were re-evaluated. The  
123 overall database and flow chart of subject selection is shown in Figure S1.

### 124 **Detection of *Leishmania infantum* infection**

125 Anti-*Leishmania* antibodies were screened by ELISA using two sources of  
126 antigens as previously described [40]. In the first method, antigen was prepared from  
127 soluble *Leishmania infantum* promastigote lysate (SLA), of a *Leishmania* isolate  
128 obtained from a patient with VL from Natal, previously typed in the World Health  
129 Organization reference laboratory (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil). Recombinant K39  
130 antigen, kindly provided by the Infectious Disease Research Institute (IDRI, Seattle,  
131 WA, USA) was also used. Each serum sample was tested in duplicate. The A<sub>405</sub> was  
132 determined using an Asys Hitech GMBH (Eugendorf, Austria) plate reader. The cut-



133 off used was the mean plus 3 standard deviations of the absorbance of negative  
134 controls. Negative control sera were derived from residents of areas non-endemic for  
135 VL or cutaneous leishmaniasis.

136 DNA was extracted from whole blood and control DNA was extracted from  
137 individuals from a non-endemic region [41]. Parasite DNA was amplified by  
138 quantitative polymerase chain reaction (qPCR) directed against the multicopy  
139 conserved region of the kinetoplast DNA mini circles of *Leishmania infantum* (kDNA)  
140 [41]. Duplicate reactions were performed on an ABI 7500 thermal cycler (Waltham,  
141 MA, USA). The number of parasites in each sample was calculated based on a  
142 standard curve generated from DNA extracted from a known number of *L. infantum*  
143 promastigotes.

#### 144 **Immune Recovery**

145 CD4+ and CD8+ T lymphocyte quantification was estimated by BD Tritest Kit  
146 and analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, USA). The  
147 detection of lower values of CD4+ T lymphocytes was based on the reference provided  
148 in the (CD4+ <410/mm<sup>3</sup>, CD8+ <190/mm<sup>3</sup>) Kit.

149 The diagnosis and rating of Graft versus Host Disease (GvHD) was made based  
150 on the National Institutes of Health (NIH) guidelines [42]. For simplification purposes,  
151 active myeloma was considered only in the patients with cytopenia or other clinical  
152 manifestations compatible with the disease.

#### 153 **Statistical Analysis**

154 The sampling error was determined *posteriori* by estimating the rate of  
155 *Leishmania infantum* infection in the study population for an interval of 100 (1- $\alpha$ ) %  
156 using the formula:

$$157 \quad \hat{B} = Z_{\alpha} \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n} \left(1 - \frac{n}{N}\right)} \quad (1)$$

158 Where  $\hat{p}$  is the proportion of the *Leishmania* infected subjects in the sample and  
159  $Z_{\alpha}$  is the corresponding percentile of the standard normal curve. According to this  
160 formula (1), with 90% certainty, the estimate sampling error of this study was  $\hat{p} =$   
161 12.4% was not greater than 5%, denoting an adequate power of the sampling scheme.

162 The t-test was used for independent or dependent samples according to the  
163 case. The comparisons of means for discrete or continuous variables with normal  
164 approximation, such as children and adolescents under 18 years old (4 patients), were  
165 excluded from the pre- and post-transplant evaluation of the body weight analysis.  
166 Comparisons of distributions or proportions between pre- and post-transplant and the  
167 association between *Leishmania* serology and qPCR was evaluated using the  
168 McNemar's Chi-Square test for matched-pair data comparing discordance of the first  
169 type,  $n_A$ , with the total of discordance,  $n_D$ , in each pair test. The hypothesis of equal  
170 proportions or equal performance was rejected when  $P_r(X^2 > X_{1,1-\alpha}^2) < \alpha$ , at a  
171 significance level of  $\alpha=5\%$ , where

$$172 \quad X^2 = \frac{\left( \left| n_A - \frac{n_D}{2} \right| - \frac{1}{2} \right)^2}{\left( \frac{n_D}{4} \right)} \quad (2)$$

173 For *Leishmania* serological tests, the concordance rate,  $r_c = 1 - n_D/n$  was also  
174 calculated. A comparison of follow-up time between subjects who were included and  
175 non-included was performed using the Mann-Whitney test for independents groups for  
176 lack of normality. Differences in familiar incomes were compared with sign test.

### 177 **Asymptomatic *Leishmania* infection in transplanted and healthy individuals**

178 This comparison was performed considering the results of data previously  
179 published on asymptomatic *Leishmania* infection at a community level [34] versus the  
180 data collected in this study. The main hypothesis tested was that there was a low  
181 incidence of asymptomatic forms of leishmaniasis in Hematopoietic Stem Cell

182 transplanted patients when compared to subjects residing in the same geographical  
183 area [34]. The selection of households and therefore subjects from the community  
184 study was based on the distance of about 300 m, which is the estimate of sand fly  
185 reach. The statistical hypotheses  $H_0: p_1 = p_2$  versus  $H_1: p_1 < p_2$  were evaluated by a  
186 unilateral t-test for independent groups whose statistics with correction for finite  
187 populations were given by

$$188 \quad t = \frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\sqrt{\left[\frac{\hat{p}_1(1-\hat{p}_1)}{n_1}\right]\left(1-\frac{n_1}{N_1}\right) + \left[\frac{\hat{p}_2(1-\hat{p}_2)}{n_2}\right]\left(1-\frac{n_2}{N_2}\right)}} \quad (3)$$

189 Where  $\hat{p}_1$  and  $\hat{p}_2$  are the samples estimates of the rates in the two studies,  $n_1$   
190 and  $n_2$  the size of their samples and  $N_1$  and  $N_2$  the size of their populations,  
191 respectively.  $H_0$  is rejected to a level  $\alpha$  if  $P_r(t < X_{n_1+n_2-2, 1-\alpha}^2) < \alpha$ .

192 All decisions made in the statistical tests were based on a 5% significance level  
193 using the software SPSS version 20 (IBM, USA).

#### 194 **Ethical considerations**

195 The research protocol was assessed and approved by the Research Ethics  
196 Committee of the Federal University of Rio Grande do Norte (CAAE  
197 12584513.1.0000.5537). All subjects included in this study, or their legal  
198 representatives, signed a consent form.

199

200 **Results**

201 **Characteristics of Study Subjects**

202           Between 2009-2016, 360 transplants were performed on 337 individuals, of  
 203 which 145 transplants were from a related donor, 55 unrelated, 2 umbilical cord blood,  
 204 2 haploidentical and 156 autologous. The causes of the transplants were: Multiple  
 205 Myeloma (82 patients), Acute Myeloid Leukemia (56 patients) or Non-Hodgkin's  
 206 Lymphoma (55 patients) (Table 1).

207 **Table 1 – Characteristics of the study subjects.**

Demographic and clinical characteristics	Total pop.	Clinical and Laboratory Evaluation (SRS Sample)
Transplanted subjects	337	73
H SCT procedures	360	76
Age at transplant (min-max)	39 (2-73)	40 (6-73)
Gender, male (%)	183 (54.3)	40 (54.7)
Diagnosis (%)		
Multiple Myeloma	82 (24.3)	20 (27.4)
Acute Myeloid Leukemia	56 (16.6)	11 (15.1)
Non-Hodgkin Lymphoma	55 (16.3)	10 (13.7)
Acute Lymphoblastic Leukemia	54 (16.0)	3 (4.1)
Chronic Myeloid Leukemia	27 (8.0)	6 (8.2)
Hodgkin Lymphoma	24 (7.1)	8 (10.9)
Aplastic Anemia	16 (4.7)	6 (8.2)
Myelodysplastic Syndrome	12 (3.6)	3 (4.1)
Others	11 (3.3)	6 (8.2)
Transplant Donor* (%)		
Related	134 (39.8)	31 (42.5)
Unrelated	52 (15.4)	7 (9.6)
Umbilical Cord	2 (0.6)	1 (1.4)
Haplo	2 (0.6)	0
Autologous	147 (43.6)	34 (46.6)
Place of residence, Northeast, Brazil (%)	331 (98.2)	73 (100)
Average Time Since Transplant, months (min-max)		30 (27-131)

208 \* In cases of more than 1 transplant, the most recent transplant is described

209

210 Of the transplanted subjects, 156 (46.3%) died, none of these subjects had VL.  
211 Among the 181 survivors, none developed VL within the time of our study. Also, the  
212 database of the hospital's Infection Control Committee reports no cases of  
213 symptomatic VL in transplanted patients since the opening of the HSCT unit in 2004..

214 Seventy-three patients with 2 or more years post-transplantation were selected  
215 for clinical, epidemiological and laboratory evaluations. However, we analyzed the  
216 overall characteristics of all subjects, included and excluded from this study regarding  
217 sex, age and disease status (Table S1). More related donor transplants were recruited  
218 (42.5 vs 25%,  $p=0.029$ ), and their median time since transplant was lower (30 vs 54.5  
219 months,  $p<0.001$ ). There was no significant difference between related and unrelated  
220 transplants. All patients included were from the Northeastern region of Brazil, which is  
221 highly endemic for VL (28) and only 2.5% of those not included were from other  
222 Brazilian regions ( $p=0.298$ ).

### 223 **Risk factors for *Leishmania* exposure prior to and after transplant**

224 There were significant changes in subjects' rate of exposure to sand flies when  
225 comparing pre- and post-transplant (Table 2). Transplanted patients frequently retired  
226 or came to live on a government pension (9.7% vs 51.7%,  $p<0.001$ ). They had  
227 improvements in their households as part of routine recommendations of the  
228 transplant team, with residence in houses with brick or concrete ceilings (41.7% vs  
229 84.7%,  $p<0.001$ ) and ceramic floors, whereas the majority of their previous homes  
230 were only covered with terracotta. They also had less contact with fruit trees (72.2%  
231 vs 59.7%,  $p=0.035$ ) and to areas where sand fly or other insects could thrive.

232

233

234 **Table 2 - Risk factors for *Leishmania* exposure prior to and after transplant.**

Risk factors for <i>Leishmania</i> exposure	Time to HSCT		<i>p</i> -value
	Pre	Post	
Retired/Government pension	7 (9.7)	37 (51.4)	<0.0001
Fruit trees in proximity of the house	52 (72.2)	43 (59.7)	0.03
Ceiling House	30 (41.7)	61 (84.7)	<0.0001
Contact with dogs	42 (58.3)	48 (66.7)	0.24
Contact with hennery	32 (44.4)	34 (47.2)	0.75
Contact with garbage	17 (26.4)	16 (25)	1.00
Residence in Rural area	15 (20.8)	15 (20.8)	1.00
Weight (mean, Kg)	65.8	67.4	0.57
Family income, median*	3	3	1.00

235 \* in Brazilian Minimal monthly wage (1 minimal wage = 1,100 reais)

236 There were no significant changes in other characteristics, such as residence  
 237 in a rural area (20.8 vs 20.8%,  $p=1.00$ ), in apartment (9.7 vs 12.5%,  $p=0.687$ ), in close  
 238 contact with dogs (59.2 vs 66.2%,  $p=0.332$ ), hennery (44.4 vs 47.2%,  $p=0.754$ ) or  
 239 accumulated litter (26.4 vs 25.0%,  $p=1.00$ ). The total family income was kept stable  
 240 (15 patients had decreased income, 15 had income raised, and 42 did not change,  
 241  $p=1.00$ ). The adult patients gained an average of 1.6 Kg after the transplant, ( $p=0.57$ ).

#### 242 ***Leishmania infantum* infection in transplanted subjects**

243 Of the 73 patients studied, 12 (16.4%, CI 95%, 8-25%) were found positive for  
 244 rK39 serology, and 10 (13.6%, CI 95%, 6-22%) for SLA serology. The results of 3  
 245 laboratory tests for *Leishmania* infection (rK39 and SLA serological tests and  
 246 *Leishmania* PCR) were analyzed for 66 of 73 subjects. There was no difference in the  
 247 performance between rK39 and SLA ( $X^2 = 0.5000$ ,  $p = 0.4795$ ), with a concordance  
 248 coefficient of  $r_C=0.97$ . There was also no difference in the results between rK39 and  
 249 qPCR ( $X^2 = 0.0000$ ,  $p = 1.0000$ ) for *Leishmania*, with a concordance coefficient of  
 250  $r_C=0.74$ . Similarly, there was no difference in performance between SLA and PCR ( $X^2$   
 251  $= 0.2667$ ,  $p = 0.6056$ ) and concordance coefficient  $r_C=0.77$ .

#### 252 **Asymptomatic *Leishmania* infection in transplanted versus community healthy** 253 **individuals**

254 There was a lower frequency of *Leishmania* infection among transplanted  
 255 subjects ( $p = 0.0157$ ) compared to endemic controls. The null hypothesis tested was  
 256 that both populations had similar level of *Leishmania* infection [ $(\hat{p}_1 = 16.4\%, n_1 =$   
 257  $73, N_1 = 141)$  and  $(\hat{p}_2 = 24.6\%, n_2 = 345, N_2 = 90000)$ ]. Of notice, 21 transplanted  
 258 patients were positive on at least one *Leishmania* test (28,7%, 95% CI: 18-39%), with  
 259 some presenting greater than twice the cut-off value (Figure 1).

260 **Figure 1 – Results of anti-*Leishmania* serology presented as a ratio of**  
 261 **absorbance/cut-off values. Each dot represents one patient. The horizontal line**  
 262 **indicates the cut-off for positive consideration.**

263 There was no significant difference between the serological positivity of  
 264 autologous and allogenic transplants (rK39: 17.6 vs 15.4%,  $p=0.795$ ; SLA: 14.7 vs  
 265 12.8%,  $p=0.815$ ), but the autologous patients had a higher proportion of qPCR positive  
 266 patients (27.6 vs 8.1%,  $p= 0.048$ ). However, none of the 73 patients showed clinical  
 267 findings compatible with VL. One patient was reported to have had VL 10 years prior  
 268 to the transplant, but the *Leishmania* serology was negative and there was no relapse  
 269 of VL after the transplant.

270 **Table 3 – Proportion of patients with positive anti-*Leishmania* serology and**  
 271 **qPCR**

Method	N	positive	%	95% CI
rK39	73	12	16.4	08-25
SLA	73	10	13.6	06-22
qPCR	66	11	16.6	07-26

272

273 Only 26 patients had performed pre-transplantation *Leishmania* serology, using  
 274 a commercial test made available by the Minister of Health, and two of them were  
 275 found positive (7.7%). Those two patients were still *Leishmania* seropositive when  
 276 tested 3.8 and 4.1 years after HSCT.

## 277 **Immunological Recovery**

278           Of the 66 patients with CD4+ T lymphocyte counts available, 19 (28.8%)  
279 showed values considered below normal, without significant correlation with type of  
280 transplant (35.5% in auto, 22.9% in allogeneic,  $p=0.258$ ) or with the Leishmania  
281 serological and PCR positivity (25.0 vs 29.6%,  $p=0.749$  and 24.3 vs 32%,  $p=0.759$ ,  
282 respectively). Quantification of CD8+ T lymphocytes was available in 63 patients and  
283 was low in only 3 patients (4.7%). The best predictor of CD4+ T lymphocyte recovery  
284 was the time since transplantation, with 48.8% of patients showing low values within  
285 30 months of transplant versus 9.1% of those transplanted for longer periods  
286 ( $p<0.001$ ).

287           Among Allo-HSCT patients, neither the use of systemic corticosteroids nor the  
288 presence of GvHD showed correlation with low CD4+ T cells (17.6 vs 31.2%,  $p=0.438$   
289 and 22.2 vs 32.1%,  $p=1.00$ , respectively). Chronic GvHD was present in 16 patients  
290 (43.2% of the 37 allo-HSCT evaluated), being 7 mild, 8 moderate and 1 severe. Eight  
291 of these patients were on systemic corticosteroid treatment. One patient used  
292 systemic steroids and had no manifestations of cGvHD at the time of evaluation.  
293 Another 2 patients used immunosuppressants, resulting in a total of 11 patients  
294 (28.2% of Allo-HSCT) using steroids or immunosuppressive drugs. Of the 33  
295 autologous patients evaluated, 5 (15.1%) relapsed of the neoplastic disorder and 3  
296 (9.1%) used corticosteroids at the time of inclusion.

297           Of the 72 patients evaluated, 21 (29.2%) were still on antimicrobial prophylaxis,  
298 with trimethoprim/sulfamethoxazole, which was more frequent among allogeneic  
299 patients (41.0 vs 15.2%,  $p=0.016$ ). All the other transplant groups used antimicrobial  
300 prophylaxis for some period after the transplant, varying between 3 and 42 months,



301 with a median of 12 months. None of the patients were on fluconazole therapy, but  
302 had taken it between 2 to 26 months post-transplant, with a median of 6 months.

### 303 **Follow up study**

304         Sixty-five subjects were reevaluated (18 of whom were *Leishmania* positive),  
305 after a median time of 15 months (ranging from 6 to 20 months) after initial recruitment.  
306 No patient developed clinic symptoms compatible with VL within this time period. Two  
307 patients with multiple myeloma died of disease progression after 10 and 18 months of  
308 the inclusion (40 and 42 months after transplantation). Both had negative *Leishmania*  
309 serology and qPCR at the time of the first evaluation.

310         Forty-three of the 65 patients were retested for Leishmania infection. Of those  
311 tested, only two had a positive *Leishmania* serology. The first one had been positive  
312 Leishmania serology since the pre-HSCT examination and continued to be SLA and  
313 rK39 positive. He remained asymptomatic except for mild GvHD. The other patient  
314 was Leishmania seronegative and *Leishmania* qPCR positive when first recruited.  
315 When reevaluated after 17 months, this patient was seropositive against both SLA and  
316 rK39. The patient was anemic, and experienced Multiple Myeloma relapse, as  
317 confirmed by bone marrow aspirate and protein electrophoresis.

318

319

## 320 Discussion

321 This is the first study evaluating the prevalence of symptomatic (VL) and  
322 asymptomatic *Leishmania infantum* infection in HSCT recipients. Previous  
323 publications have addressed this issue through VL case reports [26,27]. The absence  
324 of symptomatic VL in subjects from a transplant unit located in a VL endemic area in  
325 Brazil after more than 10 years of performing transplants is noteworthy. The incidence  
326 of VL is well documented in this area, in addition to asymptomatic *Leishmania infantum*  
327 infection in both humans and dogs [34]. Studies have shown that the rate of *L. infantum*  
328 infection can be as high as 40% in this area [43]. Although not all transplanted patients  
329 evaluated in this study were actively investigated for symptomatic VL, bone marrow  
330 aspirates for evaluation of the underlying disease are commonly performed, especially  
331 when they present pancytopenia, which could reveal the presence of *Leishmania*.

332 The prevalence of positive serology and *Leishmania* kDNA found in  
333 transplanted patients was lower than that reported in immunocompetent patients in  
334 this region of Brazil [43]. In a recent survey conducted on HIV patients carried out  
335 during the same period of this study, a slightly higher prevalence (23.6%) of  
336 asymptomatic *L. infantum* infection was also detected (Alves, manuscript in  
337 preparation). The overall increased level of *Leishmania* positivity found in our  
338 population is cause of concern, especially when considering the degree of  
339 immunosuppression that subjects undergo due to the transplant, original neoplastic  
340 disorder or for those co-infected with HIV could increase the risk of VL development.

341 The decision to include in this study only subjects 2 years post-transplant was  
342 based on the observation that 2 years after successful treatment for VL is when  
343 immunocompetent VL subjects become *Leishmania* seronegative [44]. We could  
344 expect an even shorter period of positivity for non-VL cases, especially if we take into

345 account that the transplantation procedure usually causes a reduction in humoral  
346 responses [45]. Although we observed some lifestyle changes after transplantation  
347 which may lead to a lower risk of vector exposure, the presence of anti-Leishmanial  
348 antibodies or kDNA indicated there was *Leishmania* exposure [40,44].

349         The probability of a person developing VL after *Leishmania* infection has varied  
350 over time and is related to several factors, including age, sex [46], socioeconomic  
351 status [47] and genetic background [48,49]. Another factor of growing importance is  
352 the extent of immunosuppression, including that of transplant patients [11]. Although  
353 study patients included for prospective evaluation were already at a later stage of  
354 transplantation, many of them still had significant immunosuppression indicated by low  
355 CD4+ T cell counts, GvHD, corticosteroid use or disease relapse and could potentially  
356 be at increased risk of VL development if infected.

357         Serological positivity against rK39 in asymptomatic individuals has been shown  
358 to be a good predictor of illness due to *L. donovani* infection in India [44,50,51], but  
359 this does not appear to occur with *L. infantum* in Brazil. In the HIV patients evaluated  
360 by our group, 2 of 268 (0.7% of positive cases) developed VL. In most other studies,  
361 the serological findings, or even the presence of circulating DNA, showed a low  
362 correlation with active disease [52,53]. Although there have been several reports on  
363 development of VL post-transplant [14,54,55], there has also been a report of 4 liver  
364 transplanted subjects in which the graft was shown to be positive for *Leishmania* by  
365 qPCR but none of the recipients developed VL [55]. Although the number of subjects  
366 identified in our series who were infected with *Leishmania* was too small to assess risk  
367 of VL development, it shows that at least a portion of them became infected or reactive  
368 to *L. infantum* after HSCT, but did not progress to symptomatic VL.

369 One potential explanation for protection against developing VL, in addition to  
370 the small sample size, is the possibility of cross-prophylaxis. Fluconazole and  
371 trimethoprim/sulphamethoxazole are routinely prescribed to bone marrow transplant  
372 recipients for prophylaxis of candidiasis and pneumocystosis, respectively [56,57].  
373 These drugs are not currently indicated for treatment or prophylaxis of VL, but *in vitro*  
374 studies [58] and some case reports suggest effectiveness against some forms of  
375 leishmaniasis [59–61]. All the patients evaluated herein used those two drugs for some  
376 period of time post-transplant, as part of standard practice, except for rare cases of  
377 allergy or other intolerance. These drugs could have altered the outcome for those  
378 who had *Leishmania* infection.

379 In summary, clinicians should remain alert for the possibility of VL in patients  
380 transplanted in VL endemic areas but also for those who have traveled to endemic  
381 areas and present with fever and pancytopenia, with or without splenomegaly. In this  
382 context, the combination of serology, microscopy, quantitative PCR, and culture for  
383 *Leishmania* should be considered for assessing those residing in areas endemic for  
384 VL before and after transplant. In conclusion, marrow-transplanted patients in a VL  
385 endemic area are frequently infected with *L. infantum* and they should have close  
386 follow up as early as the cancer diagnosis is made. It is important to identify people at  
387 risk of VL development, since immune recovery can be longer in the setting of  
388 immunosuppression and risk of death increased once VL develops.

389

## 390 **Acknowledgements**

391           We thank Kleber Giovanni Luz, MD, PhD (Associate Professor, Federal  
392 University of Rio Grande do Norte), for his helpful suggestions, and the staff of Hospital  
393 Rio Grande (Natal, Rio Grande do Norte, Brazil) for their help in recruiting and  
394 ascertaining patient diagnosis. We also thank John Donelson, PhD (University of  
395 Iowa) and Breanna Scorza, PhD (University of Iowa) for their helpful suggestions and  
396 revision of this manuscript and Jose Wilton Queiroz, PhD (Federal University of Rio  
397 Grande do Norte) for the statistical analysis. Part of this work was funded by CNPq  
398 (CNPQ 440893/2016-0 and 431939/2016-0).

399

400

## 401 Supporting Figure

402

### 403 **Supporting Figure 1 – Flowchart of studied subjects.**

404 Data from 337 patients transplanted between 2009 and 2016 who were retrospectively  
405 pursued for symptomatic VL, 156 of these were deceased (A); resulting in 181 living patients  
406 (B), with 43 transplanted after 2017, yielding 138 subjects (C); Seventy from these patients  
407 were selected for cross sectional evaluation by consecutive inclusion method and added to 3  
408 other patients transplanted before 2009 (D). Sixty-five of these patients were followed up for  
409 an additional median 15 months (E).

410

411  
412  
413  
414  
415  
416  
  
417  
418  
  
419  
420  
421  
  
422  
423  
424  
425  
  
426  
427  
428  
429  
  
430  
431  
432  
  
433  
434  
435  
436  
437  
  
438  
439  
440  
441  
  
442  
443  
444  
445  
  
446  
447  
448  
  
449  
450  
451  
452  
453

## Reference List

1. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den BM (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7: e35671. 10.1371/journal.pone.0035671 [doi];PONE-D-11-24894 [pii].
2. Pearson RD, Wheeler DA, Harrison LH, Kay HD (1983) The immunobiology of leishmaniasis. *Rev Infect Dis* 5: 907-927.
3. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD, Jr. (1986) New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 154: 1003-1011.
4. Maciel BL, Lacerda HG, Queiroz JW, Galvao J, Pontes NN, Dimenstein R, McGowan SE, Pedrosa LF, Jeronimo SM (2008) Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 79: 591-598. 79/4/591 [pii].
5. Costa CH, Werneck GL, Rodrigues L, Jr., Santos MV, Araujo IB, Moura LS, Moreira S, Gomes RB, Lima SS (2005) Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 99: 229-236. 10.1179/136485905X28018 [doi].
6. Leite dS-G, Romero GAS, Werneck GL (2017) Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough? *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0005772. 10.1371/journal.pntd.0005772 [doi];PNTD-D-17-00215 [pii].
7. Nascimento ET, Moura ML, Queiroz JW, Barroso AW, Araujo AF, Rego EF, Wilson ME, Pearson RD, Jeronimo SM (2011) The emergence of concurrent HIV-1/AIDS and visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 298-300. S0035-9203(11)00007-1 [pii];10.1016/j.trstmh.2011.01.006 [doi].
8. Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury AN, Romero GA, de Sousa-Gomes ML, Santos-Oliveira JR, Rabello A (2014) Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3136. 10.1371/journal.pntd.0003136 [doi];PNTD-D-13-02066 [pii].
9. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, den BM, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter HR, Lopez-Velez R, Moreno J (2008) The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21: 334-59, table. 21/2/334 [pii];10.1128/CMR.00061-07 [doi].
10. Rabello A, Orsini M, Disch J (2003) *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol* 97 Suppl 1: 17-28. 10.1179/000349803225002507 [doi].
11. Herrador Z, Gherasim A, Jimenez BC, Granados M, San Martin JV, Aparicio P (2015) Epidemiological changes in leishmaniasis in Spain according to hospitalization-based records, 1997-2011: raising awareness towards leishmaniasis in non-HIV patients. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003594. 10.1371/journal.pntd.0003594 [doi];PNTD-D-14-01825 [pii].

- 454 12. Tatarelli P, Fornaro G, Del B, V, Nicolini LA, Raiola AM, Gualandi F, Varaldo R, Di  
455 MT, Gramiccia M, Gradoni L, Angelucci E, Viscoli C, Mikulska M (2018)  
456 Visceral leishmaniasis in hematopoietic cell transplantation: Case report and  
457 review of the literature. *J Infect Chemother* 24: 990-994. S1341-  
458 321X(18)30155-7 [pii];10.1016/j.jiac.2018.05.008 [doi].
- 459 13. Akuffo H, Costa C, van GJ, Burza S, Moreno J, Herrero M (2018) New insights into  
460 leishmaniasis in the immunosuppressed. *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006375.  
461 10.1371/journal.pntd.0006375 [doi];PNTD-D-17-01427 [pii].
- 462 14. Clemente WT, Mourao PHO, Aguado JM (2018) Current approaches to visceral  
463 leishmaniasis treatment in solid organ transplant recipients. *Expert Rev Anti*  
464 *Infect Ther* 16: 391-397. 10.1080/14787210.2018.1473763 [doi].
- 465 15. Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M (2008) Leishmaniasis  
466 among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis* 8: 191-199. S1473-  
467 3099(08)70043-4 [pii];10.1016/S1473-3099(08)70043-4 [doi].
- 468 16. Gajurel K, Dhakal R, Deresinski S (2017) Leishmaniasis in solid organ and  
469 hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Transplant* 31.  
470 10.1111/ctr.12867 [doi].
- 471 17. Sirvent-von BA, Marty P, Rosenthal E, Delaunay P, Allieri-Rosenthal A, Gratecos N,  
472 Cassuto JP (2004) Visceral leishmaniasis: a new opportunistic infection in  
473 hematopoietic stem-cell-transplanted patients. *Bone Marrow Transplant* 33:  
474 667-668. 10.1038/sj.bmt.1704396 [doi];1704396 [pii].
- 475 18. Komitopoulou A, Tzenou T, Baltadakis J, Apostolidis J, Karakasis D, Harhalakis N  
476 (2014) Is leishmaniasis an "unusual suspect" of infection in allogeneic  
477 transplantation? *Transpl Infect Dis* 16: 1012-1018. 10.1111/tid.12316 [doi].
- 478 19. Torti L, Pulini S, Morelli AM, Bacci F, Di BP (2015) Visceral leishmaniasis in relapsed  
479 and overtreated multiple myeloma in the era of high dose and "novel agent"  
480 therapy. *Int J Hematol* 102: 391-393. 10.1007/s12185-015-1863-4  
481 [doi];10.1007/s12185-015-1863-4 [pii].
- 482 20. Radujkovic A, Hundemer M, Eisenbach C, Luft T, Penzel R, Goldschmidt H, Ho AD,  
483 Bellos F (2014) Visceral leishmaniasis in a patient with relapsed multiple  
484 myeloma receiving high-dose melphalan and autologous stem cell transplant.  
485 *Leuk Lymphoma* 55: 2967-2969. 10.3109/10428194.2014.911862 [doi].
- 486 21. Drexler B, Holbro A (2014) Unexpected bone marrow finding in a patient with  
487 pancytopenia after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 124: 678.  
488 10.1182/blood-2014-05-576769 [doi].
- 489 22. Martinez-Losada C, Martin C, Cuenca T, Torres A (2013) Duodenal leishmaniasis  
490 after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 48: 614-615.  
491 bmt2012190 [pii];10.1038/bmt.2012.190 [doi].
- 492 23. Bautista G, Ramos A, Gil S (2012) Visceral leishmaniasis in hematopoietic stem cell  
493 transplantation. *Transpl Int* 25: e83-e85. 10.1111/j.1432-2277.2012.01487.x  
494 [doi].

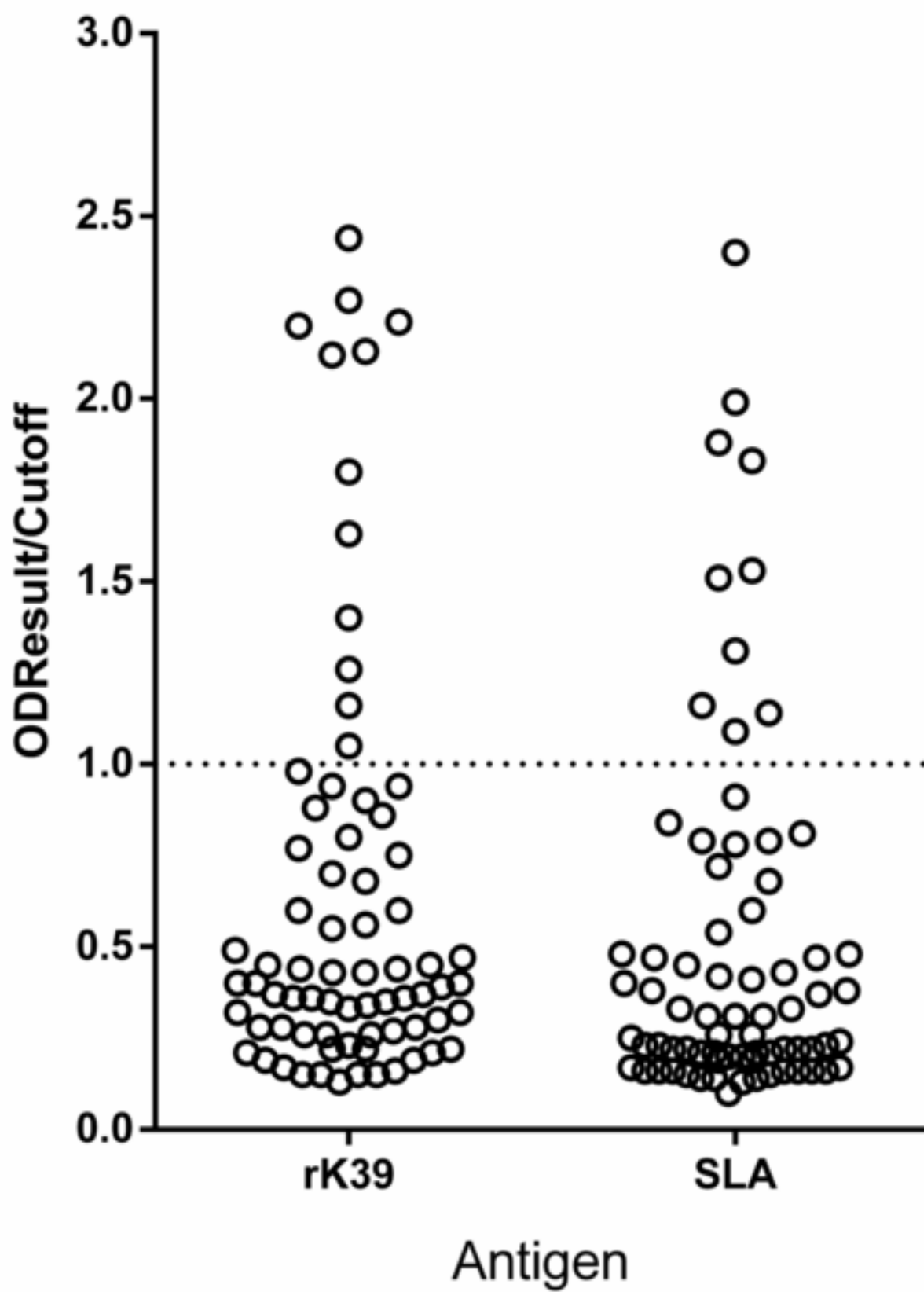


- 495 24. Agteresch HJ, van 't Veer MB, Cornelissen JJ, Sluiters JF (2007) Visceral  
496 leishmaniasis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone*  
497 *Marrow Transplant* 40: 391-393. 1705728 [pii];10.1038/sj.bmt.1705728 [doi].
- 498 25. Dantas BM, Campilho F, Branca R, Pinho VC, Silva C, Sousa T, Mendes C, Campos  
499 A (2014) Visceral leishmaniasis: a differential diagnosis to remember after  
500 bone marrow transplantation. *Case Rep Hematol* 2014: 587912.  
501 10.1155/2014/587912 [doi].
- 502 26. Machado CM, Martins TC, Colturato I, Leite MS, Simione AJ, Souza MP, Mauad MA,  
503 Colturato VR (2009) Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant  
504 recipients. Review of the literature and experience of a Brazilian HSCT  
505 center. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51: 309-324. S0036-  
506 46652009000600002 [pii];10.1590/s0036-46652009000600002 [doi].
- 507 27. van GJ, Carrillo E, Lopez-Velez R, Lynen L, Moreno J (2014) Leishmaniasis in  
508 immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect* 20: 286-299.  
509 10.1111/1469-0691.12556 [doi];S1198-743X(14)60274-3 [pii].
- 510 28. Jeronimo SM, Duggal P, Braz RF, Cheng C, Monteiro GR, Nascimento ET, Martins  
511 DR, Karplus TM, Ximenes MF, Oliveira CC, Pinheiro VG, Pereira W, Peralta  
512 JM, Sousa J, Medeiros IM, Pearsoni RD, Burns TL, Pugh EW, Wilson ME  
513 (2004) An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*,  
514 the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Scand J*  
515 *Infect Dis* 36: 443-449.
- 516 29. Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, Satoskar A,  
517 Dissanayake S, Santos RS, Silva MR, Shaw JJ, David JR, Maguire JH (2002)  
518 Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*  
519 66: 334-337.
- 520 30. Dos Santos Marques LH, DA Rocha IC, Reis IA, DA Cunha GM, Oliveira E,  
521 Pfeilsticker TR, DE Araujo VE, Morais MH, Rabello A, Carneiro M (2016)  
522 *Leishmania infantum*: illness, transmission profile and risk factors for  
523 asymptomatic infection in an endemic metropolis in Brazil. *Parasitology* 1-11.  
524 S0031182016002134 [pii];10.1017/S0031182016002134 [doi].
- 525 31. Jeronimo SM, Teixeira MJ, Sousa A, Thielking P, Pearson RD, Evans TG (2000)  
526 Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern  
527 Brazil: long-term follow-up. *Clin Infect Dis* 30: 608-609. CID990676  
528 [pii];10.1086/313697 [doi].
- 529 32. Jose FF, da Silva IM, Araujo MI, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM (2001)  
530 [Evaluation of the sensitization power of Montenegro skin test]. *Rev Soc Bras*  
531 *Med Trop* 34: 537-542. S0037-86822001000600007 [pii].
- 532 33. Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa AA,  
533 Lima JW, Pearson RD (1992) Epidemiology of visceral leishmaniasis in  
534 northeast Brazil. *J Infect Dis* 166: 1124-1132.
- 535 34. Lima ID, Lima ALM, Mendes-Aguiar CO, Coutinho JFV, Wilson ME, Pearson RD,  
536 Queiroz JW, Jeronimo SMB (2018) Changing demographics of visceral  
537 leishmaniasis in northeast Brazil: Lessons for the future. *PLoS Negl Trop Dis*  
538 12: e0006164. 10.1371/journal.pntd.0006164 [doi];PNTD-D-17-01368 [pii].

- 539 35. Bogdan C (2008) Mechanisms and consequences of persistence of intracellular  
540 pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol* 10: 1221-1234.  
541 CMI1146 [pii];10.1111/j.1462-5822.2008.01146.x [doi].
- 542 36. Dykewicz CA (2001) Guidelines for preventing opportunistic infections among  
543 hematopoietic stem cell transplant recipients: focus on community respiratory  
544 virus infections. *Biol Blood Marrow Transplant* 7 Suppl: 19S-22S.
- 545 37. Gale RP, Seber A, Bonfim C, Pasquini M (2016) Haematopoietic cell transplants in  
546 Latin America. *Bone Marrow Transplant* 51: 898-905. bmt201635  
547 [pii];10.1038/bmt.2016.35 [doi].
- 548 38. Jaimovich G, Rolon JM, Baldomero H, Rivas M, Hanesman I, Bouzas L, Bonfim C,  
549 Palma J, Kardus-Urueta A, Ubidia D, Bujan-Boza W, Gonzalez-Ramella O,  
550 Ruiz-Arguelles G, Gomez-Almaguer D, Espino G, Fanilla E, Gonzalez D,  
551 Carrasco A, Galeano S, Borelli G, Hernandez-Gimenez M, Pasquini M,  
552 Kodera Y, Gratwohl A, Gratwohl M, Nunez J, Szer J, Gale RP, Niederwieser  
553 D, Seber A (2017) Latin America: the next region for haematopoietic  
554 transplant progress. *Bone Marrow Transplant* 52: 798. bmt201748  
555 [pii];10.1038/bmt.2017.48 [doi].
- 556 39. RIPSAs (2019) TabNet Win32 3.0: D.2.5 Taxa de incidência da leishmaniose visceral.
- 557 40. Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, Jeronimo  
558 SM (2002) The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant  
559 K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in  
560 differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 67: 344-  
561 348.
- 562 41. Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R,  
563 Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME (2011) Serial  
564 quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and  
565 quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol* 49:  
566 3892-3904. 49/11/3892 [pii];10.1128/JCM.r00764-11 [doi].
- 567 42. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, Palmer J,  
568 Weisdorf D, Treister NS, Cheng GS, Kerr H, Stratton P, Duarte RF, McDonald  
569 GB, Inamoto Y, Vigorito A, Arai S, Datile MB, Jacobsohn D, Heller T, Kitko  
570 CL, Mitchell SA, Martin PJ, Shulman H, Wu RS, Cutler CS, Vogelsang GB,  
571 Lee SJ, Pavletic SZ, Flowers ME (2015) National Institutes of Health  
572 Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic  
573 Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working  
574 Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 21: 389-401. S1083-  
575 8791(14)01378-0 [pii];10.1016/j.bbmt.2014.12.001 [doi].
- 576 43. Lima ID, Queiroz JW, Lacerda HG, Queiroz PV, Pontes NN, Barbosa JD, Martins  
577 DR, Weirather JL, Pearson RD, Wilson ME, Jeronimo SM (2012) *Leishmania*  
578 *infantum chagasi* in northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban  
579 perimeter. *Am J Trop Med Hyg* 86: 99-107. 86/1/99  
580 [pii];10.4269/ajtmh.2012.10-0492 [doi].
- 581 44. Singh S, Kumari V, Singh N (2002) Predicting kala-azar disease manifestations in  
582 asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection  
583 of antibody against recombinant K39 antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 568-  
584 572. 10.1128/cdli.9.3.568-572.2002 [doi].

- 585 45. Gandhi MK, Egner W, Sizer L, Inman I, Zambon M, Craig JI, Marcus RE (2001)  
586 Antibody responses to vaccinations given within the first two years after  
587 transplant are similar between autologous peripheral blood stem cell and  
588 bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 28: 775-781.  
589 10.1038/sj.bmt.1703239 [doi].
- 590 46. Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simoes TC, Nascimento BW, da Silva ES,  
591 Struchiner CJ (2013) Factors associated with visceral leishmaniasis in the  
592 Americas: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 7:  
593 e2182. 10.1371/journal.pntd.0002182 [doi];PNTD-D-12-01429 [pii].
- 594 47. Alvar J, Yactayo S, Bern C (2006) Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 22:  
595 552-557. S1471-4922(06)00239-X [pii];10.1016/j.pt.2006.09.004 [doi].
- 596 48. Weirather JL, Duggal P, Nascimento EL, Monteiro GR, Martins DR, Lacerda HG,  
597 Fakiola M, Blackwell JM, Jeronimo SM, Wilson ME (2017) Comprehensive  
598 candidate gene analysis for symptomatic or asymptomatic outcomes of  
599 *Leishmania infantum* infection in Brazil. *Ann Hum Genet* 81: 41-48.  
600 10.1111/ahg.12180 [doi].
- 601 49. Fakiola M, Strange A, Cordell HJ, Miller EN, Pirinen M, Su Z, Mishra A, Mehrotra S,  
602 Monteiro GR, Band G, Bellenguez C, Dronov S, Edkins S, Freeman C,  
603 Giannoulatou E, Gray E, Hunt SE, Lacerda HG, Langford C, Pearson R,  
604 Pontes NN, Rai M, Singh SP, Smith L, Sousa O, Vukcevic D, Bramon E,  
605 Brown MA, Casas JP, Corvin A, Duncanson A, Jankowski J, Markus HS,  
606 Mathew CG, Palmer CN, Plomin R, Rautanen A, Sawcer SJ, Trembath RC,  
607 Viswanathan AC, Wood NW, Wilson ME, Deloukas P, Peltonen L,  
608 Christiansen F, Witt C, Jeronimo SM, Sundar S, Spencer CC, Blackwell JM,  
609 Donnelly P (2013) Common variants in the HLA-DRB1-HLA-DQA1 HLA class  
610 II region are associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. *Nat*  
611 *Genet* 45: 208-213. ng.2518 [pii];10.1038/ng.2518 [doi].
- 612 50. Hasker E, Kansal S, Malaviya P, Gidwani K, Picado A, Singh RP, Chourasia A, Singh  
613 AK, Shankar R, Menten J, Wilson ME, Boelaert M, Sundar S (2013) Latent  
614 infection with *Leishmania donovani* in highly endemic villages in Bihar, India.  
615 *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2053. 10.1371/journal.pntd.0002053 [doi];PNTD-D-  
616 12-01410 [pii].
- 617 51. Hasker E, Malaviya P, Gidwani K, Picado A, Ostyn B, Kansal S, Singh RP, Singh  
618 OP, Chourasia A, Kumar SA, Shankar R, Wilson ME, Khanal B, Rijal S,  
619 Boelaert M, Sundar S (2014) Strong association between serological status  
620 and probability of progression to clinical visceral leishmaniasis in prospective  
621 cohort studies in India and Nepal. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2657.  
622 10.1371/journal.pntd.0002657 [doi];PNTD-D-13-01595 [pii].
- 623 52. Maia Z, Viana V, Muniz E, Goncalves LO, Mendes CM, Mehta SR, Badaro R (2016)  
624 Risk Factors Associated with Human Visceral Leishmaniasis in an Urban  
625 Area of Bahia, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 16: 368-376.  
626 10.1089/vbz.2015.1880 [doi].
- 627 53. Orsini M, Canela JR, Disch J, Maciel F, Greco D, Toledo A, Jr., Rabello A (2012)  
628 High frequency of asymptomatic *Leishmania* spp. infection among HIV-  
629 infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil.  
630 *Trans R Soc Trop Med Hyg* 106: 283-288. S0035-9203(12)00009-0  
631 [pii];10.1016/j.trstmh.2012.01.008 [doi].

- 632 54. Carrasco-Anton N, Lopez-Medrano F, Fernandez-Ruiz M, Carrillo E, Moreno J,  
633 Garcia-Reyne A, Perez-Ayala A, Rodriguez-Ferrero ML, Lumbreras C, San-  
634 Juan R, Alvar J, Aguado JM (2017) Environmental Factors as Key  
635 Determinants for Visceral Leishmaniasis in Solid Organ Transplant  
636 Recipients, Madrid, Spain. *Emerg Infect Dis* 23: 1155-1159.  
637 10.3201/eid2307.151251 [doi].
- 638 55. Clemente WT, Rabello A, Faria LC, Peruhype-Magalhaes V, Gomes LI, da Silva TA,  
639 Nunes RV, Iodith JB, Prottil KZ, Fernandes HR, Cortes JR, Lima SS, Lima AS,  
640 Romanelli RM (2014) High prevalence of asymptomatic *Leishmania* spp.  
641 infection among liver transplant recipients and donors from an endemic area  
642 of Brazil. *Am J Transplant* 14: 96-101. 10.1111/ajt.12521 [doi].
- 643 56. Marr KA, Bow E, Chiller T, Maschmeyer G, Ribaud P, Segal B, Steinbach W,  
644 Wingard JR, Nucci M (2009) Fungal infection prevention after hematopoietic  
645 cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 44: 483-487. bmt2009259  
646 [pii];10.1038/bmt.2009.259 [doi].
- 647 57. Gea-Banacloche J, Masur H, Arns da CC, Chiller T, Kirchhoff LV, Shaw P, Tomblyn  
648 M, Cordonnier C (2009) Regionally limited or rare infections: prevention after  
649 hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 44: 489-494.  
650 bmt2009260 [pii];10.1038/bmt.2009.260 [doi].
- 651 58. Beach DH, Goad LJ, Holz GG, Jr. (1988) Effects of antimycotic azoles on growth and  
652 sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 31:  
653 149-162. 0166-6851(88)90166-1 [pii].
- 654 59. Rodriguez-Cuartero A, Perez-Blanco FJ, Lopez-Fernandez A (1990) Co-trimoxazole  
655 for visceral leishmaniasis. *Infection* 18: 40.
- 656 60. Murphy KJ, Bong AC (1981) Co-trimoxazole for systemic leishmaniasis. *Lancet* 1:  
657 323-324. S0140-6736(81)91929-2 [pii].
- 658 61. Torrus D, Boix V, Massa B, Portilla J, Perez-Mateo M (1996) Fluconazole plus  
659 allopurinol in treatment of visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 37:  
660 1042-1043. 10.1093/jac/37.5.1042 [doi].  
661  
662



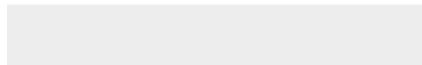


Click here to access/download  
**Supporting Information**  
Soares\_FigS1.tif





Click here to access/download  
**Supporting Information**  
Supporting Table 1.docx



## 6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar a prevalência de Leishmaniose Visceral e infecção assintomática por *Leishmania infantum* em pacientes transplantados de células tronco hematopoiéticas. A ausência de formas sintomáticas de LV após mais de 10 anos de funcionamento de uma unidade de TCTH em uma área de prevalência tão alta é notável. Os pacientes do banco de dados não foram ativamente avaliados nesta pesquisa para o diagnóstico de Calazar, mas é improvável que algum paciente tenha se apresentado com a forma sintomática da doença e que o diagnóstico não tenha sido feito. Existe um risco constante de LV, visto que a taxa de transmissão de *Leishmania* é alta na área, com alta incidência de infecção tanto em humanos como em cães(15). Além disso, boa parte dos pacientes são submetidos a mielograma para avaliação da sua doença de base, especialmente quando se apresentam com pancitopenia, o que revelaria as inclusões de *Leishmania* mesmo que essa não fosse uma hipótese diagnóstica.

A taxa de positividade sorológica encontrada nos pacientes transplantados é menor que em pessoas imunocompetentes nessa região(15). Isso provavelmente é um reflexo indireto das orientações dadas aos pacientes transplantados que visam reduzir exposição a outras infecções ou desenvolvimento de DECH. Baseadas em cuidados sanitários gerais e redução da exposição ao sol, essas medidas podem reduzir o contato com o mosquito vetor e, conseqüentemente, a infecção.

A decisão de incluir apenas pacientes com mais de 02 anos de transplante se baseou no fato de que a sorologia para *Leishmania* tende a negativar após esse período em pacientes tratados de formas sintomáticas da doença(15,44). Considerando que avaliamos pacientes assintomáticos, nós esperaríamos um período ainda menor de positividade, especialmente quando levamos em consideração que o procedimento de transplante costuma levar a redução dos níveis de vários anticorpos(6). Portanto, a identificação de anticorpos contra o antígeno rK39 indica que houve replicação da *Leishmania*, após o transplante, o que é reforçado pela presença de kDNA circulante uma proporção significativa deles. Levando em consideração a baixa exposição ao mosquito vetor sugerida pela avaliação epidemiológica dos pacientes incluídos, é necessário considerar que essa replicação pode ter ocorrido por reativação do



parasita, e não por reinfeção. No entanto, nosso estudo não foi desenhado de forma a ser capaz de responder essa questão. Em futuras investigações, a associação de sorologia direcionada aos antígenos da saliva do mosquito *Lutzomyia sp* poderá ajudar nessa definição.

A positividade sorológica para rK39 se mostrou um bom preditor do desenvolvimento posterior de formas sintomáticas da doença em pacientes infectados por *Leishmania donovani* na Índia(44,45). Mas isso parece não ser o caso para a *L. infantum*. Nos pacientes com HIV estudados pelo nosso grupo (Alves, submetido), apenas 0,7% dos positivos desenvolveram Calazar. Na maioria dos estudos, o achado sorológico, ou mesmo a presença de kDNA circulante, estavam associados a uma taxa muito baixa de adoecimento(46,47). Em um interessante estudo conduzido em receptores de transplante de fígado, nenhum dos 04 pacientes que receberam enxerto hepático de doadores positivos para kDNA de *Leishmania* adoeceu(48). Portanto, o número de pacientes seguidos prospectivamente no nosso estudo foi pequeno para detectar uma baixa incidência da doença. Mas, ainda assim, esse achado prova que pelo mesmo uma parte dos pacientes que se infectam ou reativam *Leishmania infantum* após o TCTH são capazes de resolver a infecção espontaneamente.

Os fatores que podem ter contribuído para uma baixa incidência de Calazar ainda são motivo de especulação. Neste estudo, pudemos observar que os linfócitos dos pacientes transplantados se comportam de forma semelhante aos pacientes imunocompetentes quando expostos a antígenos de *Leishmania in vitro*. Apesar dos pacientes incluídos já estarem um período tardio do transplante, quando as infecções secundárias tendem a reduzir, muitos deles ainda são considerados imunossuprimidos devido às baixas contagens de linfócitos TCD4+, DECH, uso de corticoide e doença hematológica em atividade. Além disso, essa possibilidade de proteção conferida pela reconstituição imune não justifica a ausência de casos de Calazar nos pacientes em fase precoce do transplante (avaliados aqui de forma retrospectiva no registro de transplantes e nos prontuários dos pacientes incluídos).

Alguns dos relatos de casos disponíveis, por outro lado, consideram a possibilidade de um possível fator desencadeante da doença nos casos sintomáticos. A reativação do Citomegalovírus em receptores de transplantes alogênicos parece desencadear um estado de ativação imune semelhante ao encontrado no HIV, embora muito menos intenso. Em 04 dos 14 casos de LV

sintomática no contexto do TCTH publicados, o autor relatava que o adoecimento havia sido precedido pela reativação do Citomegalovírus(10,29,30,32). Nos outros casos, não havia referência ao vírus, não nos permitindo saber se esse fator havia sido avaliado ou não.

Mas um fator previamente não mencionado nos relatos de casos e revisões é a possibilidade de profilaxia cruzada entre a *Leishmania* e outros microorganismos mais classicamente pesquisados no TCTH. O fluconazol e a sulfametoxazol+trimetoprima rotineiramente prescritos visando evitar candidíase e pneumocistose, respectivamente(2,8), já foram reportados como possíveis tratamentos para LV. Embora não se constituam os medicamentos de escolha, alguns estudos *in vitro*(49) e relatos de casos(50–52) sugerem efetividade. Todos os pacientes incluídos aqui usaram essas medicações por algum período pós-TCTH. E por se tratar de uma rotina na unidade de transplante estudada, praticamente todos os pacientes transplantados também usaram, exceto por raros casos de alergia ou outra intolerância.

Apesar disso, os clínicos devem ainda se manter alerta pela possibilidade de LV em pacientes transplantados em área endêmica, ou procedentes dessas regiões, e que se apresentem com febre, pancitopenia, com ou sem esplenomegalia. Nessa situação, no entanto, a sorologia, ou mesmo o PCR, não se constitui um método diagnóstico confiável, visto que muitos pacientes podem apresentar essas alterações laboratoriais de forma assintomática e os achados clínicos da LV são frequentemente compartilhados com problemas frequentes em pacientes transplantados, como recaída ou infecção por outro patógeno. A identificação das inclusões de *Leishmania* em aspirado de medula óssea ou em biópsia continua sendo necessário para confirmação diagnóstica nesses casos.

## 7. CONCLUSÕES

A incidência de formas sintomáticas de leishmaniose visceral em pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas é baixa mesmo em áreas de grande endemicidade.

Pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas modificam seus hábitos de vida e condições de moradia, tornando-os teoricamente menos expostos ao mosquito vetor da Leishmaniose visceral.

A prevalência de infecção assintomática é inferior à encontrada em pessoas imunocompetentes.

A sorologia e a PCR para kDNA não são bons preditores de adoecimento, nem possibilitam o diagnóstico de formas sintomáticas da LV de forma adequada.

Pacientes na fase tardia do TCTH que moram em área endêmica frequentemente se infectam ou reativam *Leishmania*, mas são capazes de resolver a infecção espontaneamente.

Pacientes na fase tardia do TCTH apresentam padrões de ativação e exaustão de linfócitos semelhantes a controles saudáveis.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006 Apr 27;354(17):1813–26.
2. Marr KA, Bow E, Chiller T, Maschmeyer G, Ribaud P, Segal B, et al. Fungal infection prevention after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2009;44(8):483–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/bmt.2009.259>
3. Puissant-Lubrano B, Huynh A, Attal M, Blancher A. Evolution of peripheral blood T lymphocyte subsets after allogeneic or autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Immunobiology* [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 Jul 20];219(8):611–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24721705>
4. van Heijst JWJ, Ceberio I, Lipuma LB, Samilo DW, Wasilewski GD, Gonzales AMR, et al. Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med* [Internet]. 2013 Mar [cited 2015 Nov 5];19(3):372–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3594333&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2012 Jul [cited 2018 Jun 1];19(4):324–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22517587>
6. Gandhi MK, Egner W, Sizer L, Inman I, Zambon M, Craig JIO, et al. Response to vaccination Antibody responses to vaccinations given within the first two years after transplant are similar between autologous peripheral blood stem cell and bone marrow transplant recipients Summary: *Bone Marrow Transplant*. 2001;28(June):775–81.
7. Ogonek J, Juric MK, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol*. 2016;7(NOV):1–15.
8. Gea-Banacloche J, Masur H, Arns da Cunha C, Chiller T, Kirchoff L, Shaw P, et al. Regionally limited or rare infections: prevention after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2009;44(8):489–94. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/bmt.2009.260>
9. Ullmann AJ, Schmidt-Hieber M, Bertz H, Heinz WJ, Kiehl M, Krüger W, et

- al. Infectious diseases in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: prevention and prophylaxis strategy guidelines 2016. *Ann Hematol.* 2016;
10. Komitopoulou A, Tzenou T, Baltadakis J, Apostolidis J, Karakasis D, Harhalakis N. Is leishmaniasis an unusual suspect of infection in allogeneic transplantation? *Transpl Infect Dis* [Internet]. 2014 Dec [cited 2017 Oct 2];16(6):1012–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tid.12316>
  11. Van Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(4):286–99.
  12. Jaimovich G, Martinez Rolon J, Baldomero H, Rivas M, Hanesman I, Bouzas L, et al. Latin America: the next region for haematopoietic transplant progress. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2017 May 23 [cited 2017 Aug 21];52(5):671–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28112744>
  13. Gale RP, Seber A, Bonfim C, Pasquini M. Haematopoietic cell transplants in Latin America. *Bone Marrow Transplant.* 2016 Jul 21;51(7):898–905.
  14. Alvar J, Bern C, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PlosOne.* 2012;7(5).
  15. Lima ID, Queiroz JW, Lacerda HG, Queiroz PVS, Pontes NN, Barbosa JDA, et al. *Leishmania infantum chagasi* in Northeastern Brazil: Asymptomatic infection at the urban perimeter. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86(1):99–107.
  16. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 2006;22(12):552–7.
  17. Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* [Internet]. 1986;154(4):639–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3745974>
  18. Costa CHN, Werneck GL, Rodrigues L, Santos M V, Araújo IB, Moura LS, et al. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 2005;99(3):229–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829132>
  19. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*

- [Internet]. 2012 Jun [cited 2017 Nov 15];26(2):309–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632641>
20. Dos Santos Marques LH, DA Rocha ICM, Reis IA, DA Cunha GMR, Oliveira E, Pfeilsticker TR, et al. Leishmania infantum: illness, transmission profile and risk factors for asymptomatic infection in an endemic metropolis in Brazil. Parasitology [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2020 Apr 6];144(4):546–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27894365>
  21. Jeronimo SM, Teixeira MJ, Sousa A d, Thielking P, Pearson RD, Evans TG. Natural history of Leishmania (Leishmania) chagasi infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. Clin Infect Dis [Internet]. 2000 Mar 1 [cited 2020 Apr 6];30(3):608–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10722458>
  22. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. Parasit Vectors [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2017 Jul 31];9(1):118. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/9/1/118>
  23. Weirather JL, Duggal P, Nascimento EL, Monteiro GR, Martins DR, Lacerda HG, et al. Comprehensive candidate gene analysis for symptomatic or asymptomatic outcomes of Leishmania infantum infection in Brazil. Ann Hum Genet [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2020 Apr 6];81(1):41–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28054334>
  24. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. Clin Microbiol Rev. 2008;21(2):334–59.
  25. Gajurel K, Dhakal R, Deresinski S. Leishmaniasis in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Transplant. 2017;31(1):1–12.
  26. Torti L, Pulini S, Morelli AM, Bacci F, Di Bartolomeo P. Visceral leishmaniasis in relapsed and overtreated multiple myeloma in the era of high dose and “novel agent” therapy. Int J Hematol [Internet]. 2015 Oct 10 [cited 2017 Sep 17];102(4):391–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26358056>
  27. Radujkovic A, Hundemer M, Eisenbach C, Luft T, Penzel R, Goldschmidt H, et al. Visceral leishmaniasis in a patient with relapsed multiple myeloma

- receiving high-dose melphalan and autologous stem cell transplant. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2014 Dec 16 [cited 2017 Sep 17];55(12):2967–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24707945>
28. Drexler B, Holbro A. Unexpected bone marrow finding in a patient with pancytopenia after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* [Internet]. 2014 Jul 31 [cited 2017 Sep 17];124(5):678. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25221805>
29. Martínez-Losada C, Martin C, Cuenca T, Torres A. Duodenal leishmaniasis after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2013 Apr 8 [cited 2017 Oct 2];48(4):614–5. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/bmt.2012.190>
30. Bautista G, Ramos A, Gil S. Visceral leishmaniasis in hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Int* [Internet]. 2012 Jul [cited 2017 Sep 17];25(7):e83–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22551448>
31. Machado CM, Martins TC, Colturato I, Leite MS, Simione AJ, Souza MP de, et al. Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a Brazilian HSCT center. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2009 [cited 2017 Oct 2];51(6):309–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209266>
32. Agteresch HJ, van 't Veer MB, Cornelissen JJ, Sluiter JF. Visceral leishmaniasis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2007 Aug 18 [cited 2017 Oct 2];40(4):391–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17572716>
33. Sirvent-von Buelzingsloewen A, Marty P, Rosenthal E, Delaunay P, Allieri-Rosenthal A, Gratecos N, et al. Visceral leishmaniasis: a new opportunistic infection in hematopoietic stem-cell-transplanted patients. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2004 Mar 19 [cited 2017 Oct 2];33(6):667–8. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.bmt.1704396>
34. Dantas Brito M, Campilho F, Branca R, Pinho Vaz C, Silva C, Sousa T, et al. Visceral leishmaniasis: a differential diagnosis to remember after bone marrow transplantation. *Case Rep Hematol* [Internet]. 2014;2014:587912. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4276680&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
35. Tatarelli P, Fornaro G, Del Bono V, Nicolini LA, Raiola AM, Gualandi F, et al. Visceral leishmaniasis in hematopoietic cell transplantation: Case report and review of the literature. *J Infect Chemother* [Internet]. 2018 Dec [cited 2019 Aug 15];24(12):990–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1341321X18301557>
  36. Heidenreich S, van Randenbrough A, Ayuk F, Kröger N, Schmiedel S, Asemissen A, et al. Pancytopenia of unknown origin in a 52-year-old patient [Internet]. Vol. 60, *Internist*. Springer Verlag; 2019 [cited 2021 Apr 30]. p. 867–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30969356/>
  37. Dykewicz C. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients: Focus on community respiratory virus infections. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2001;7(12):19S-22S.
  38. Seber A, Vergueiro C. O tratamento continua em casa: Orientações sobre o período pós-transplante de medula óssea [Internet]. São Paulo: AMEO - Associação de Medula Óssea; 2018. Available from: [www.ameo.org.br/capacitarparacurar](http://www.ameo.org.br/capacitarparacurar)
  39. Thomas ED, Buckner CD, Rudolph RH, Fefer A, Storb R, Neiman PE, et al. Allogeneic marrow grafting for hematologic malignancy using HL-A matched donor-recipient sibling pairs. *Blood* [Internet]. 1971 Sep [cited 2018 Jun 15];38(3):267–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4399859>
  40. RIPSAs - TabNet Win32 3.0: D.2.5 Taxa de incidência da leishmaniose visceral [Internet]. [cited 2017 Oct 19]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defctohtm.exe?idb2012/d0205.def>
  41. Braz RFS, Nascimento ET, Martins DRA, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67(4):344–8.
  42. Weirather JL, Jeronimo SMB, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol*



- [Internet]. 2011 Nov [cited 2018 Apr 21];49(11):3892–904. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22042830>
43. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2015;21(3):389–401. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.12.001>
  44. Singh S, Kumari V, Singh N. Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* [Internet]. 2002;9(3):568–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=119988&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  45. Hasker E, Malaviya P, Gidwani K, Picado A, Ostyn B, Kansal S, et al. Strong Association between Serological Status and Probability of Progression to Clinical Visceral Leishmaniasis in Prospective Cohort Studies in India and Nepal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):19.
  46. Maia Z, Viana V, Muniz E, Gonçalves LO, Mendes CMC, Mehta SR, et al. Risk Factors Associated with Human Visceral Leishmaniasis in an Urban Area of Bahia, Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2016;16(6):368–76. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2015.1880>
  47. Orsini M, Canela JR, Disch J, Maciel F, Greco D, Toledo A, et al. High frequency of asymptomatic *Leishmania* spp. infection among HIV-infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2012;106(5):283–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.01.008>
  48. Clemente WT, Rabello A, Faria LC, Peruhype-Magalhães V, Gomes LI, Da Silva TAM, et al. High prevalence of asymptomatic *leishmania* spp. infection among liver transplant recipients and donors from an endemic area of Brazil. *Am J Transplant*. 2014;14(1):96–101.
  49. Beach DH, Goad LJ, Holz Jr GG. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 1988;31(2):149–162. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8375483>

50. A. Rodriguez-Cuartero, F. J. Pérez-Blanco AL-F. Co-trimoxazole for Visceral Leishmaniasis [letter]. *Infection*. 1990;18(1):40.
51. Murphy KJ, Bong ACW. Co-trimoxazole for Systemic Leishmaniasis [letter]. *Lancet*. 1981;1:323–4.
52. Torrús D, Boix V, Massa B, Portilla J, Pérez-Mateo M. Fluconazole plus allopurinol in treatment of visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemoth*. 1995;37(5):1042–3.

## 9. APÊNDICE

## 9.1. Apêndice 1 - Ficha de avaliação clínica e epidemiológica

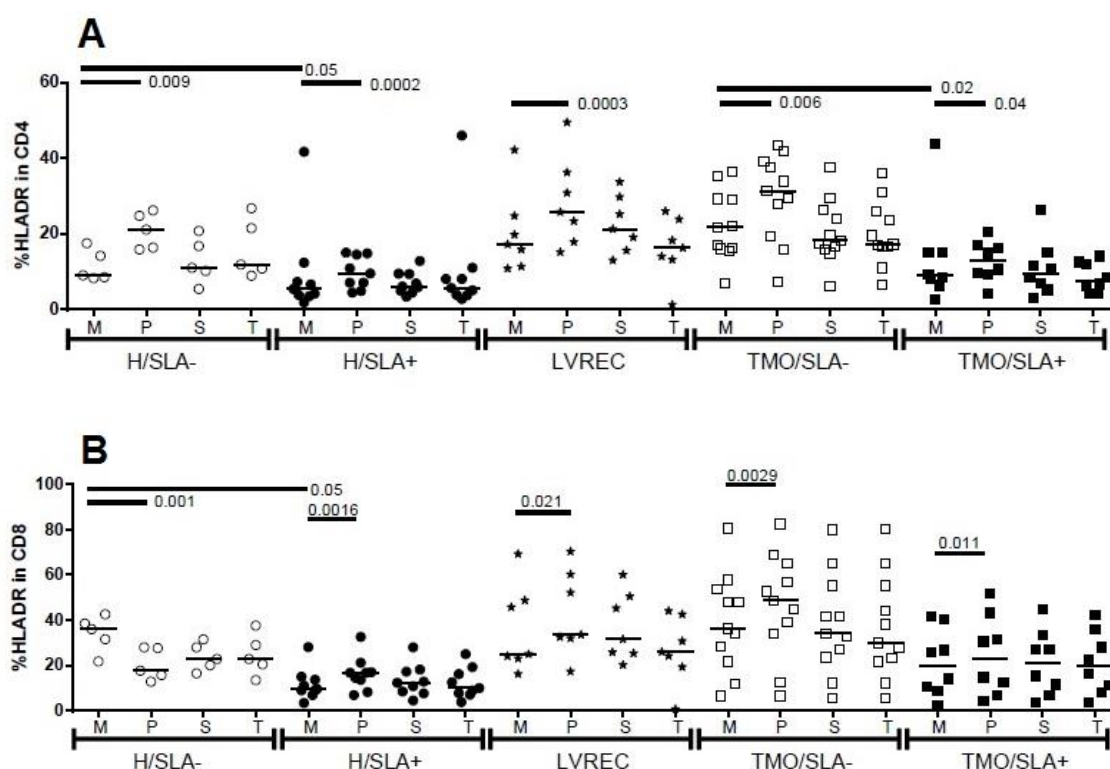
10. IDENTIFICAÇÃO PARA CADASTRO NO LAG_IG:				0-Inclusão: / /	
Nome:					
1-Data Nasc.: / /		2-Sexo: 1. M 2. F		Fone: ( ) / ( )	
Nome Mãe:					
<b>Dados Epidemiológicos ATUAIS:</b>					
3 Peso Atual (perguntar ou medir):					g
4 Altura Atual (perguntar ou medir):					cm
5-Estado:		6-Cidade:		7-Bairro/Distrito:	
Nome Log.					
Bloco:		Apto.	8-Cep:		9-Início (aaaa/mm) /
7.1 - Mora em Zona Rural? [0= Nao; 1 = sim]					
10-Mora em casa ou Apartamento? [0=casa; 1=apartamento]					
11-Em caso de Apartamento, qual andar?					
12-A casa é forrada? [0= Nao; 1 = sim]					
13-Há cães na sua residência ou na do vizinho? [0= Nao; 1 = sim]					
14-Há plantas frutíferas na sua residência ou na do vizinho? [0= Nao; 1 = sim]					
15-Há galinheiro na sua residência ou na do vizinho? [0= Nao; 1 = sim]					
16-Há acúmulo de lixo na sua casa ou no terreno vizinho? [0= Nao; 1 = sim]					
16.1- Há esgoto exposto? [0= Nao; 1 = sim]					
17 Tempo de residência no município atual: 1: < 6 meses; 2: 6 m a 1 ano; 3: 1 a 2 anos 4: 2 a 5 anos; 5: > 5 anos					
18 Residiu em outros municípios por período igual ou superior a 6 meses? 0: Não; 1=sim					
19 Se sim, Quais?					
Município		UF	DE (MÊS/ANO)		ATÉ (MÊS/ANO)
20-Qual é sua ocupação?					
1. Agricultor		2. Autônomo	3. Diarista	4. Estudante	
5. Empregado doméstico		6. Industriário	7. Comerciante	8. Desempregado	
9. Do lar		10. Aposentado	11. pedreiro	12. funcionário publico	
13. Outro _____					

<b>21</b>	Renda familiar: 0: sem renda; 1: até 1 Salário Mínimos (SM); 2: 1 a 2 SM; 3: 2,1 a 3 SM.; 4: 3,1 a 4 SM; 5: > 4 SM] 109. NS; 110: NR			
<b>Dados Epidemiológicos ANTES DO TRANSPLANTE:</b>				
<b>22</b>	Peso na época do TMO			g
<b>23</b>	Altura na época do TMO			cm
<b>24</b> -Estado:	<b>25</b> -Cidade:	<b>26</b> -Bairro/Distrito:		
<b>26.1</b> - Morava em <b>Zona Rural</b> ? [0= Não; 1 = sim]				
<b>27</b>	Morava em casa ou Apartamento? [0=casa; 1=apartamento]			
<b>28</b> - Em caso de Apartamento, qual andar?				
<b>29</b> -A casa era forrada? [0= Não; 1 = sim]				
<b>30</b> -Havia <b>cães</b> na sua residência ou na do vizinho? [0= Não; 1 = sim]				
<b>31</b> -Havia <b>plantas frutíferas</b> na sua residência ou na do vizinho? [0= Não; 1 = sim]				
<b>32</b> -Havia <b>galinheiro</b> na sua residência ou na do vizinho? [0= Não; 1 = sim]				
<b>33</b> -Havia <b>acúmulo de lixo</b> na sua casa ou no terreno vizinho? [0= Não; 1 = sim]				
<b>33.1</b> - Havia <b>Esgoto exposto</b> ? [0= Não; 1 = sim]				
<b>34</b>	Qual era o seu trabalho?			
	1. Agricultor 5. Empregado doméstico 9. Do lar 13. Outro _____	2. Autônomo 6. Industriário 10. Aposentado	3. Diarista 7. Comerciante 11. pedreiro	4. Estudante 8. Desempregado 12. funcionário publico
<b>35</b>	Renda familiar: 0: sem renda; 1: até 1 Salário Mínimos (SM); 2: 1 a 2 SM; 3: 2,1 a 3 SM.; 4: 3,1 a 4 SM; 5: > 4 SM] 109. NS; 110: NR			
<b>36</b>	Data TMO:			/ /
<b>37</b>	Indicação do TMO: 1: LMA; 2: LLA; 3: Anemia Aplástica; 4: Linfoma de Hodgkin; 5: Linfoma NÃO-Hodgkin; 6: LMC; 7: SMD; 8: Anemia Falciforme; 9: Talassemia; 10: Mieloma Múltiplo; 11: Outra: _____			
<b>38</b>	Tipo: 1: Alogênico Aparentado; 2:Alogênico Não Aparentado; 3: Autólogo; 4: Sangue de Cordão			
<b>39</b>	Condicionamento: 1: BuCy (16/120 ou equivalente); 2: FluBu (16 ou equivalente); 3: BuMel (16/140) 4: Cy200; 5: CyTBI (1200); 6: FluCy; 7: FluTBI; 8: FluMel; 9: Mel200; 10: Mel140; 11: BEAM 12: Outro não-mieloablativo: _____; 13:Outro Mieloablativo: _____			
<b>40</b>	Condicionamento usou Timoglobulina (ATG)? [0: Não; 1: Sim]			
<b>41</b>	Qual Status atual da Doença de Base? [0: Remissão; 1: Atividade] Para LMC: 0 Resp. Citogenética; 1: Resp. Hematológica, mantendo Ph1 ou Bcr/Abl; 3: Recaída Hemat. Para Mieloma: 0: SEM manifestação Clínica e Hematológica; 1: COM manifestação clínica ou Hematol.			
<b>42</b>	Tem DECH? [0: Não; 1: DECH Leve; 2: DECH Moderada; 3: DECH grave]			
<b>43</b>	Usando Corticóide? [0: Não; 1: Menos que 0,5mg/kg/dia; 2: Mais que 0,5 mg/kg/dia]			
<b>44</b>	Usando outro imunossupressor/Imunomodulador? [0: Não; 1: Ciclosporina; 2: Tacrolimus;			

	3: Micofenolato; 4: Talidomida; 5: outro_____]	
<b>45</b>	Usou <b>Fluconazol</b> após TMO? [0: Não; 1: Até um mês após; 2: Dois meses; etc; 99: Uso Atual]	
<b>46</b>	Usou <b>Bactrim</b> após TMO? [0: Não; 1: Até um mês após; 2: Dois meses após; etc; 99: Uso Atual]	
<b>47</b>	Vacinou para <b>Tétano</b> após TMO? [0: Não; 1: Um mês após TMO; 2: Dois meses após; 3: Três; etc]	
<b>48</b>	Fez <b>Tríplice Viral</b> após TMO? [0: Não; 1: Um mês após TMO; 12: <b>Um Ano</b> após; 24: Dois anos; etc]	
<b>49</b>	Você já teve Calazar? [0=não, 1= sim]	
<b>50</b>	Se sim, quando? [Antes dos TMO: -1: Um ano antes, -2: dois anos antes; -3: três anos antes; etc Após o TMO: +1: um após; +2: dois anos após; ect]	
<b>51</b>	Alguma pessoa que morava com você ou algum vizinho já teve calazar? [0: Não, 1: Sim]	
<b>52</b>	Se sim, quando? [Antes dos TMO: -1: Um ano antes, -2: dois anos antes; -3: três anos antes; etc Após o TMO: +1: um após; +2: dois anos após; etc]	
<b>53</b>	Hepatomegalia [0: Não, 1: Sim]	
<b>54</b>	Esplenomegalia [0: Não, 1: Sim]	

### 10.1. Apêndice 2 - Ativação e senescência linfocitária

Um total de 19 pacientes consecutivos foram selecionados para avaliação de resposta linfocitária aos antígenos de *Leishmania*, sendo 08 com sorologia positiva e 11 negativa. Em nenhum dos grupos, seja paciente transplantado, controles saudáveis ou mesmo pacientes recuperados de LV, pudemos identificar um aumento de ativação linfocitária após estímulo com antígenos de *Leishmania* (Figura 2). No entanto, a capacidade de expansão desses linfócitos foi comprovada pela resposta ao PHA.

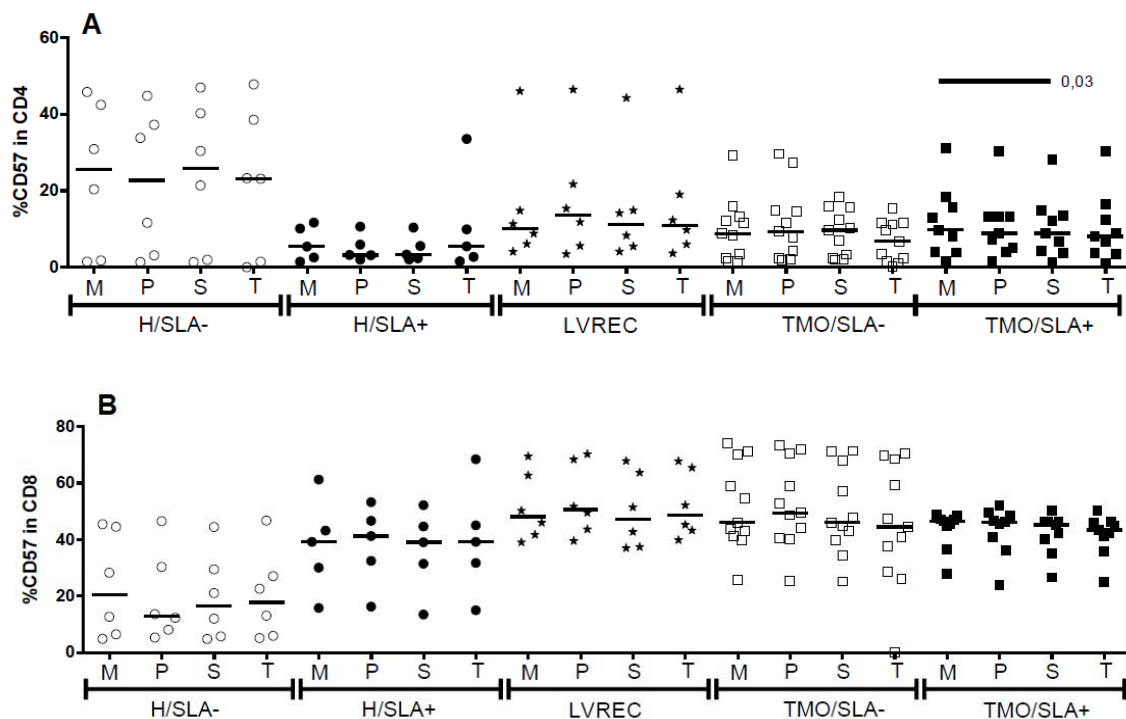


**Figura 2 – Painel de ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>(A) e Linfócitos TCD8<sup>+</sup>(B).**

Os linfócitos expostos ao estímulo com PHA (P) apresentam uma maior proporção de ativação em relação ao não estimulado (M). Os níveis basais de ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (M) em pacientes transplantados com sorologia negativa (TMO/SLA-) são maiores que nos pacientes com sorologia positiva (TMO/SLA+)(painel A). As barras representam o índice de significância estatística. (H/SLA- = Controles saudáveis com sorologia negativa; H/SLA+ = Controles com sorologia positiva; LVREC = Pacientes recuperados de leishmaniose visceral; M = incubação com meio; P = incubação com ficoeritrina; S = incubação com antígenos solúvel de *Leishmania*; T = incubação com toxina tetânica).

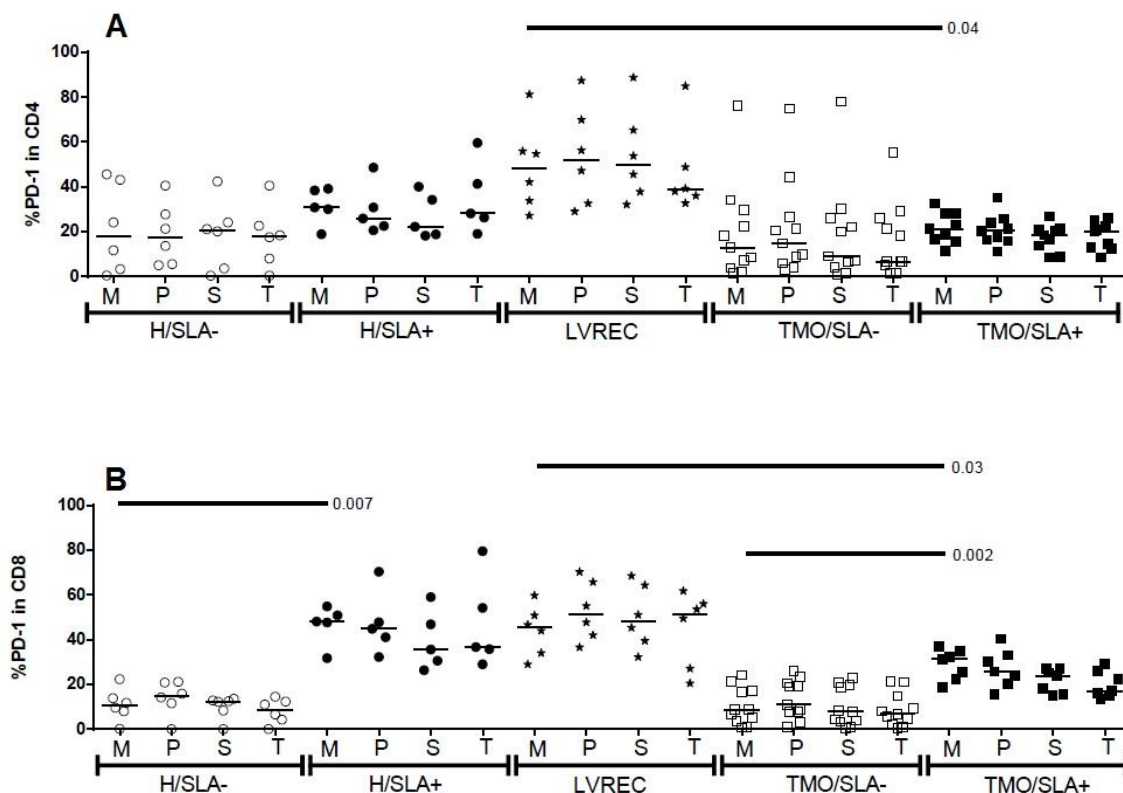
Por outro lado, pacientes transplantados com sorologia negativa apresentavam estado basal de ativação em linfócitos CD4<sup>+</sup> maior que os pacientes com sorologia negativa (HLA-DR sem estímulo de pacientes com SLA negativo 21,7%, pacientes com SLA positivo 8,86%,  $p=0,02$ ). Essa diferença se assemelha ao encontrado em controles saudáveis (HLA-DR sem estímulo em controles com SLA negativo 9,03%, com SLA positivo 5,6%,  $p=0,05$ ).

No painel de exaustão/anergia/senescência também não foi possível observar modificação significativa na proporção de linfócitos que expressam os marcadores CTLA4 e PD-1 após exposição ao antígeno de *Leishmania*. Entretanto, no grupo de pacientes transplantados com sorologia positiva houve redução na expressão de CD57 apenas nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (9,7 vs 8,8,  $p=0,03$ )(Figura 3).



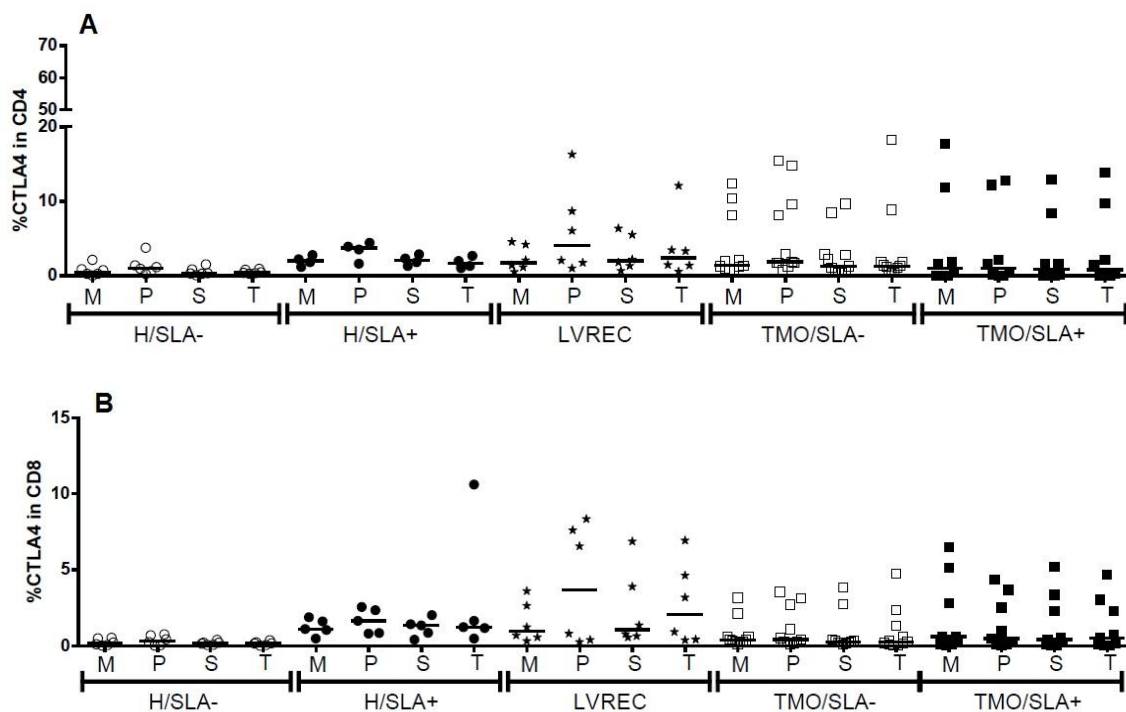
**Figura 3 – Expressão de CD57 em linfócitos T.** Os grupos apresentaram resultados comparáveis, havendo apenas uma redução da expressão em pacientes transplantados com sorologia positiva após exposição ao antígeno de *Leishmania* (painel A, TMO/SLA+ M e S).

Os níveis basais de expressão de PD-1 nos pacientes recuperados de LV foram maiores do que os encontrados nos pacientes transplantados (Figura 4). Quando analisamos o subgrupo de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, também observamos que tanto os pacientes transplantados quanto os controles saudáveis apresentam maiores níveis basais de expressão de PD-1 quando estão com sorologia positiva (31,4 vs 8,7 em pacientes transplantados,  $p=0,002$ ; 48,1 vs 10,7 em controles saudáveis,  $p=0,007$ ).



**Figura 4 – Paine de anergia de linfócitos T com PD-1.** O número basal de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em pacientes recuperados de LV é maior que o encontrado em pacientes transplantados (painel A, M-LVREC vs M-TMO/SLA+). Essa diferença também é observada nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (painel B). Em linfócitos T CD8<sup>+</sup>, tanto pacientes transplantados como os controles saudáveis apresentam uma maior expressão de PD-1 quando tem sorologia positiva.





**Figura 5 – Expressão de CTLA4 em linfócitos T.** Todos os grupos apresentaram padrão de expressão semelhante (H/SLA- = Controles saudáveis com sorologia negativa; H/SLA+ = Controles com sorologia positiva; LVREC = Pacientes recuperados de leishmaniose visceral); TMO/SLA- = pacientes transplantados com sorologia negativa; TMO/SLA+ = pacientes transplantados com sorologia positiva; M = incubação com meio; P = incubação com ficoeritrina; S = incubação com antígenos solúvel de *Leishmania*; T = incubação com toxina tetânica)