



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE (PPgCS)



**MARCADORES IMUNOLÓGICOS DE PROTEÇÃO NA INFECÇÃO
POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*: UM ESTUDO DE COORTE**

Aline do Couto Muniz

TESE DE DOUTORADO

Salvador (Bahia), 2016

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
CCL2	Proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)
CD16	Anticorpo monoclonal marcador de linfócitos natural killer (NK).
CD3	Complexo Receptor-CD3 de Antígeno de Células T
CD56	Anticorpo monoclonal marcador de linfócitos natural killer (NK).
CF	Contatos Familiares
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CXCL 9	Monoquina induzida por interferon gama.
CXCL10/ IP-10	Proteína indutora de IFN- γ .
CXCR3	Receptor de quimiocinas da família CXC
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay, teste imunoenzimático
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FOXP3	Fator de transcrição da família <i>forkhead</i> expresso por linfócitos T reguladores de CD4 ⁺
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen - D Related
IC	Intervalo de confiança
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1B	Interleucina 1 beta
IL-5	Interleucina 5
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutâneo Difusa
LD	Leishmaniose Disseminada

LM	Leishmaniose Mucosa
LV	Leishmaniose Visceral
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHA	Phytohemaglutinina
PPD	“purified protein derivative” – Intradermo reação para tuberculose
QTF-G	Quantiferon Gold in Tube
RM	Reação de Montenegro
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SC	Subclínico
SFB	Soro fetal bovino
SLA	Antígeno solúvel de leishmania
T CD4+	Célula T apresentando a molécula CD4 na sua superfície.
T CD8	Linfócitos T CD8
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
Th1	T “helper” (auxiliadora) do tipo 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Achados demográficos, epidemiológicos e imunológicos em 47 contatos familiares (n=308) de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) de acordo com o desenvolvimento de LC ou infecção subclínica (SC) por *L. braziliensis*.
- TABELA 2.** Dados demográficos e epidemiológicos em 101 contatos 49 familiares com evidência de resposta imune ao antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA).
- TABELA 3.** Razão de incidência e risco relativo de leishmaniose cutânea 55 de acordo com a resposta imune em uma coorte de contatos familiares de pacientes com leishmaniose cutânea.
- TABELA 4.** Reversibilidade da Reação de Montenegro e da produção de 60 IFN- γ em 89 indivíduos com infecção subclínica que apresentaram testes positivos durante a coorte.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Desenho de estudo e estudos imunológicos de uma coorte de contatos familiares (CF) em uma área endêmica para a *L. braziliensis* e os estudos imunológicos realizados. 32
- FIGURA 2:** Correlação entre a Reação de Montenegro e a produção de IFN- γ (transformação logarítmica) em indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis*. 50
- FIGURA 3A:** Correlação entre a produção de IFN- γ e CXCL9 (transformação logarítmica para ambos) em indivíduos com infecção subclínica para *L. braziliensis*. 51
- FIGURA 3B:** Correlação entre a produção de IFN- γ e CXCL10 (Transformação logarítmica para ambos) em indivíduos com infecção subclínica para *L. braziliensis*. 51
- FIGURA 4A:** Correlação entre a Reação de Montenegro e produção de CXCL9 (Transformação logarítmica) em indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis*. 52
- FIGURA 4B:** Correlação entre a Reação de Montenegro e produção de CXCL10 (Transformação logarítmica) em indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis*. 53
- FIGURA 5.** Desenvolvimento de leishmaniose cutânea ou infecção subclínica por *L. braziliensis* em contatos familiares de pacientes com leishmaniose cutânea 54
- FIGURA 6 (A), (B) e (C)** Análise de células produtoras de IFN- γ . 56

FIGURA 7A e 7B. Fagocitose e a capacidade de monócitos de indivíduos subclínicos (SC) em controlar infecção por *L. braziliensis*. 58

FIGURA 8A e 8B. Reação de Montenegro (n = 11) e produção de IFN- γ (n = 13) em resposta ao antígeno de *Leishmania* em CF que negativaram ou positivaram os testes imunológicos durante a coorte. 60

I. RESUMO

MARCADORES IMUNOLÓGICOS DE PROTEÇÃO NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*: UM ESTUDO DE COORTE. INTRODUÇÃO:

Leishmaniose cutânea (LC) é a forma clínica mais comum causada por *Leishmania braziliensis*. Dez a 15% de indivíduos sadios residentes em uma área endêmica de *Leishmania* sem história prévia de LC apresentam um teste intradérmico para o antígeno solúvel de leishmania (SLA) positivo e são considerados como tendo a forma subclínica (SC) da doença. Os mecanismos envolvidos no controle da infecção SC por *L. braziliensis* são desconhecidos. **OBJETIVO:** Determinar fatores imunológicos

associados com o desenvolvimento da infecção subclínica ou da leishmaniose cutânea (LC) em indivíduos expostos à infecção por *Leishmania braziliensis*.

METODOLOGIA: Uma coorte de 308 contatos familiares (CF) de pacientes com LC, sem história de doença foi estabelecido em 2010 em uma área endêmica de leishmaniose tegumentar. Os indivíduos foram acompanhados por cinco anos e participaram de avaliações clínicas e estudos imunológicos. A avaliação da produção de IFN- γ e quimiocinas em culturas de sangue total estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) e o teste de intradermo reação de Montenegro (RM) foram realizados no início do estudo (ano zero), ano dois e no ano quatro. A identificação das células produtoras de IFN- γ foi realizada por citometria de fluxo e foi determinada a capacidade dos monócitos em controlar a infecção por *Leishmania*. Durante todo o período os indivíduos foram monitorados para identificar o aparecimento de LC.

RESULTADOS: A infecção por *L. braziliensis* foi evidenciada em 118 (38,3%) indivíduos. LC foi documentada em 45 (14,6%) indivíduos, 101 (32,8%) apresentaram infecção SC e 162 (52,6%) não tinham indícios de exposição à *L. braziliensis*. A razão de infecção para a doença foi de 3,2:1 e apenas 3% dos indivíduos que apresentaram apenas produção de IFN- γ adoeceram. Houve uma correlação direta e uma concordância razoável entre a RM e a produção de IFN- γ [κ : 0,23 (95% IC: 0.12-0.35)]. Enquanto a produção de IFN- γ por células NK foi associada com proteção, uma RM positiva não impediu o desenvolvimento da doença. Monócitos de indivíduos SC controlaram mais a infecção do que monócitos de indivíduo com LC. Pode haver negatização tanto da RM quanto da produção de IFN- γ . **CONCLUSÕES:** Proteção contra a LC foi associada com a produção de IFN- γ por células NK, resultados do teste intradérmico negativos e

maior capacidade dos monócitos dos indivíduos SC em impedir e controlar o crescimento do parasito na infecção por *L.braziliensis*.

PALAVRAS-CHAVES: 1. Leishmaniose Cutânea; 2. Infecção subclínica por *L. braziliensis*; 3. Teste intradérmico com antígeno de leishmania (Reação de Montenegro); 4. Quimiocinas. 5. Coorte 6. Resposta Imune

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GERAL

Determinar fatores imunológicos associados com o desenvolvimento da infecção subclínica ou da leishmaniose cutânea em indivíduos expostos à infecção por *Leishmania braziliensis*.

II.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 1) Determinar a existência de associação entre a positividade do teste de Montenegro (RM) e a proteção contra a leishmaniose cutânea (LC).
- 2) Determinar a existência de associação entre a produção de IFN- γ e de quimiocinas e a proteção contra a doença (LC).
- 3) Identificar subpopulações de células produtoras de IFN- γ em indivíduos com infecção subclínica pela *L. braziliensis*;

III. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania* e possui uma ampla distribuição geográfica em áreas tropicais e subtropicais das Américas (Brasil, 2009).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da doença e em nosso meio é causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Schriefer et al., 2009). As lesões são caracterizadas por uma única úlcera com bordas elevadas, localizadas preferencialmente nos membros inferiores. O teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno solúvel de *Leishmania*, a reação de Montenegro (RM), tem uma alta sensibilidade para o diagnóstico da LC e tem sido também utilizado para identificar indivíduos expostos ao parasito na ausência de doença (Llanos Cuentas et al., 1984; Follador et al., 2002; Gomes-Silva, et al., 2007). A literatura tem mostrado que 10 a 15% dos indivíduos sadios residentes em áreas endêmicas e sem história prévia de LC apresentam a RM positiva (Davies et al., 1995; Follador et al., 2002). Recentemente foi documentado que a produção *in vitro* de IFN- γ antígeno específica aumenta a sensibilidade para detectar exposição à *L.braziliensis* (Schnorr et al., 2012). Os indivíduos que apresentam uma RM positiva e/ou produção de IFN- γ sem manifestações clínicas de LC, são classificados como tendo uma infecção subclínica (SC) causada por *L. braziliensis* (Schnorr et al., 2012).

O principal mecanismo envolvido na morte da *Leishmania* é a ativação do macrófago induzida por IFN- γ (Louzir et al., 1998; Melby, 2002; Qi et al., 2004). A resposta imune do tipo Th1 é importante para controlar o crescimento do parasito e a disseminação da doença (Mougneau et al., 2011; França-Costa et al., 2015), mas na infecção com *L. braziliensis* os parasitas persistem e a forte resposta do tipo Th1 está

associada com a patologia (Antonelli et al., 2005; Novais et al., 2013). Já foi documentado que existe uma correlação direta entre a frequência de células T CD4⁺ expressando IFN- γ e TNF e o tamanho da lesão (Antonelli et al., 2005) e pacientes com LC e leishmaniose mucosa (LM) apresentam produção elevada de IFN- γ e TNF (Oliveira et al., 2014). Foi observado também que existe uma correlação direta entre a frequência de células TCD4⁺ e células TCD8⁺ expressando granzima e a intensidade do processo inflamatório (Faria et al., 2005; Cardoso et al., 2015).

O desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora contra patógenos intracelulares requer a ação de células da imunidade inata e adaptativa. Após a infecção por *Leishmania* diferentes tipos de células da imunidade inata interagem com o parasita. Embora os macrófagos sejam as principais células hospedeiras da *Leishmania*, estudos utilizando modelos animais têm demonstrado que neutrófilos e células dendríticas são também capazes de fagocitar o parasito na fase inicial da infecção (Pearson & Steigbigel, 1981; Gorak et al., 1998). Células NK, produzindo IFN- γ , ativam as células fagocíticas para matar a *Leishmania* (Laskay et al., 1995; Maasho et al., 1998; Remer et al., 2010; Rasolzadeh et al., 2015).

A produção de quimiocinas durante a imunidade inata também é importante no controle da infecção (Müller et al., 2001; Ritter & Körner, 2002; Teixeira et al., 2006; Campanelli et al., 2010). Como os indivíduos com infecção subclínica produzem menos IFN- γ , TNF, e granzima B quando comparado com pacientes com LC (Cardoso et al., 2015), uma possibilidade é que o controle da infecção por *L. braziliensis* nesses indivíduos com infecção subclínica esteja associado à imunidade inata.

Para melhor compreender os fatores envolvidos na proteção e na susceptibilidade na infecção por *L. braziliensis*, foi estabelecida em 2010 uma coorte de contatos familiares de pacientes com LC que não apresentavam história de doença e que

residiam em uma área de transmissão de *L. braziliensis*. Neste estudo, nós propomos determinar a incidência de LC nessa população e identificar fatores do hospedeiro associados com a forma subclínica ou com o desenvolvimento da doença, nos indivíduos expostos à infecção por *L. braziliensis*.

IV. REVISÃO DE LITERATURA

IV.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, família *Trypanosomatidae*, onde mais de 20 espécies de *Leishmania* são transmitidas ao homem pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas sendo que, 98 espécies de flebotomínios são de importância médica. É uma doença antroponótica tendo como reservatórios animais silvestres, domésticos e também o próprio homem. As leishmanioses são classificadas clinicamente em leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar americana (LTA) (WHO, 2016a). Ambas foram inicialmente identificadas no Velho Mundo. Cerca de 95% dos casos de LTA ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central sendo que mais de dois terços dos novos casos de LTA ocorrem em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e a República Árabe Síria. Estima-se que 0,7 milhões a 1,3 milhões de novos casos ocorrem em todo o mundo anualmente e que cerca de 400 milhões de pessoas estão expostas à infecção (WHO, 2016c). A leishmaniose tegumentar é uma enfermidade polimórfica da pele e das mucosas e apresenta diferentes espectros clínicos que são: a leishmaniose cutânea (LC) (Llanos Cuentas et al., 1984), a leishmaniose mucosa (Marsden, 1986) a

leishmaniose disseminada (LD) (Bonfante-Garrido et al., 1996; Turetz, et al., 2002). A LC é a forma mais prevalente ocorrendo em mais de 90% dos indivíduos com a doença. A LC é um importante problema de saúde pública cuja incidência no país de 1,46 casos por 10.000 habitantes (WHO, 2016). Em 2014 foram identificados 10.387 casos de LTA na região Norte, 4969 casos na região Nordeste, 1.460 casos na região Sudeste, 373 casos na região Sul e 3.038 casos na região Centro-Oeste do país (Brasil, 2016). Na década de 80 havia uma incidência de 8,1 casos por 1.000 pessoas no sul da Bahia, onde *L. braziliensis* era responsável por mais de 95% dos casos de LC (Jones et al., 1987).

No Brasil as espécies de *Leishmania* encontradas são: *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiffi* e a *L. lindenbergi* (Lainson, 1983; Grimaldi et al., 1989; Marzochi & Schubach (1999) Apud Costa, 2005; WHO, 2010). A infecção é transmitida por um grande número de espécies de flebotomíneos sendo o *Lutzomia whitmani* e *Lu. intermedia* os principais vetores da *Leishmania (Viannia) braziliensis* que é a única espécie de *Leishmania* encontrada na região endêmica onde o estudo foi desenvolvido (Schriefer et al., 2009).

IV.2 TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Os parasitas do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitos de um mamífero a outro.

As espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da subfamília Phebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia*

– no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo (Grimaldi et al., 1989; Killick-Kendrick, 1990). Nos flebotomíneos as *Leishmanias* vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo. As formas amastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo se diferenciam em formas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas que posteriormente são inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada. Durante esse processo, o conteúdo da glândula salivar é depositado no local da picada, promovendo o bloqueio de mecanismos hemostáticos do hospedeiro que beneficiam o vetor na obtenção do alimento (Ribeiro, 1987; Titus & Ribeiro, 1990). Nos hospedeiros mamíferos, os parasitos assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. Uma vez dentro do hospedeiro, em poucos minutos, as formas promastigotas são rapidamente internalizadas pelas células fagocíticas, incluindo macrófagos e neutrófilos. Após a internalização nos fagolisossomas dos macrófagos, as promastigotas iniciam sua diferenciação na forma amastigota e por divisão binária proliferam e lisam o macrófago hospedeiro para assim, infectar outros macrófagos circulantes.

IV. 3 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A leishmaniose tegumentar no Brasil, causada principalmente pelo protozoário da espécie *L. braziliensis*, apresenta amplo espectro clínico de manifestações, incluindo a leishmaniose cutânea (LC) (Jones et al., 1987; Gontijo, 2003), leishmaniose mucosa (LM) (Ridley et al., 1980; Azambuja et al., 1985; Marsden, 1986), leishmaniose disseminada (LD) (Carvalho E. et al., 1994; Turetz et al., 2002; Leopoldo et al., 2006) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) causada principalmente pela *L. amazonensis* (Bittencourt et al., 1989).

A leishmaniose cutânea se caracteriza pela presença de uma lesão ulcerativa e é diagnosticada através do teste de hipersensibilidade tardia positivo ao antígeno de *Leishmania* também chamando de Reação de Montenegro, identificação do parasito através da cultura do aspirado de lesão, através da técnica de PCR ou histopatologia compatível com LC. É a forma mais comum da doença, representando 90 a 95% dos casos da LTA e se manifesta com ulceração cutânea única, bordas elevadas com fundo granulomatoso, geralmente autolimitada, podendo ocorrer cura espontânea (Convit et al. 1993). A lesão cutânea se instala no sítio de entrada do parasita após períodos de incubação estimados entre 2 semanas e alguns meses. Na infecção causada pela *L. braziliensis*, a fase inicial, com duração de 8 a 20 dias, se caracteriza por pápula ou nódulo seguido de ulceração superficial e adenomegalia regional indolor maior que 3 cm (Machado et al., 2002). Cerca de 3% dos indivíduos com a LC evoluem para a forma mais grave da doença, a leishmaniose mucosa, que é caracterizada por uma exacerbada imunidade mediada por células e graves lesões de desenvolvimento lento e progressivo que comprometem a região mucosa e submucosa, principalmente o nariz, boca e orofaringe (Marsden, 1986; Lessa et al., 2007).

A leishmaniose cutânea disseminada é uma forma de leishmaniose emergente no nordeste do Brasil, causada na maioria das vezes por *L. braziliensis*. Esta forma clínica se distingue por apresentar numerosas lesões papulosas e acneiformes não ulcerativas, localizadas na face, tronco e membros. Após a formação da lesão primária, parasitos são disseminados pelo sangue ou via linfática sendo então, estabelecida a infecção cujo tempo de incubação ocorre por 24 horas. Isto pode justificar as lesões distantes do local da picada (Carvalho E. et al., 1994; Turetz et al., 2002).

IV.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A sobrevivência das leishmanias dentro do flebotomíneo, a transmissão das formas promastigotas e a sobrevivência no hospedeiro vertebrado depende da capacidade da *Leishmania* em evadir o sistema imune do hospedeiro. Sendo assim, o desfecho da leishmaniose tegumentar depende tanto da eficácia na eliminação do parasita quanto na indução de uma resposta imune adequadamente modulada. O principal mecanismo de defesa contra a *Leishmania* é mediado por uma resposta imune Th1, que depende da produção de IFN- γ para que a infecção seja controlada, através da ativação de macrófagos e conseqüentemente a morte do parasito (Louzir et al., 1998; Melby, 2002; Nylén et al., 2003; Qi et al., 2004; Mougneau et al., 2011). Porém, a resposta imune Th1 exagerada observada durante a infecção por *L. braziliensis* tem sido associada com inflamação grave e patologia (Bacellar et al., 2002; Antonelli et al., 2005; Faria et al., 2005). IL-12 produzida por macrófagos e células dendríticas, IFN- γ produzido por células NK e células T previamente ativadas, promovem o desenvolvimento desta resposta Th1 cuja importância para controlar o crescimento e disseminação do parasita já é bem documentada na LC (Ribeiro-De-Jesus et al., 1998; Bottrel et al., 2001; Bacellar et al., 2002; Mougneau et al., 2011).

Nas diferentes manifestações clínicas da doença, ao penetrar no hospedeiro a *Leishmania* interage com diferentes tipos celulares da resposta imune inata, incluindo neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. As células dendríticas, desempenham um papel importante na resistência à infecção por *Leishmania* através da apresentação antigênica, ativação de células Th1 e produção de IL-12 (Stebut, von et al., 1998; Lemos

et al., 2004). Os macrófagos são as principais células que albergam o protozoário e consequentemente a sua sobrevivência ou morte dependem da ativação dessas células. A ativação dos macrófagos resulta no aumento da expressão de HLA-DR, moléculas co-estimulatórias, produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e TNF), óxido nítrico (NO), e quimiocinas (Liew, et al., 1990 (A); Green et al., 1991; Almeida et al., 2003; Conrad et al., 2007; Giudice et al., 2012). A produção de IFN- γ por células NK e células T é um mecanismo importante de ativação de macrófagos para matar a *Leishmania* (Scharton & Scott, 1993; Antonelli et al., 2004).

Neste contexto, a produção de IFN- γ é importante para o controle da infecção por *Leishmania* por estimular a produção de óxido nítrico e superóxido por fagócitos (Murray et al., 1983; Liew, et al., 1990 (b); Carneiro et al., 2016). Na ausência da ativação de células Th1 a produção de IFN- γ é baixa ou ausente e os macrófagos perdem a capacidade de destruir a *Leishmania*. Entretanto, nas formas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar, apesar de existir uma resposta imune protetora, os pacientes evoluem para a doença.

Células NK representam também a primeira linha de defesa após infecção por *Leishmania* (Lieke et al., 2011; Carvalho L. et al., 2012). Na resposta imune inata, as células NK têm sido correlacionadas com proteção natural e cura da leishmaniose devido a sua habilidade de secretar IFN- γ para ativar macrófagos e ajudar na preparação de uma resposta Th1 protetora (Maasho et al., 1998; Nylén et al., 2003). Células NK ativadas estão presentes em culturas de células não estimuladas de controles endêmicos que resistem à infecção por *Leishmania*, sugerindo um papel de proteção contra a LC (Maasho et al., 1998).

Entretanto, na leishmaniose tegumentar causada pela *L. braziliensis* a ativação de células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias estão correlacionadas com

patologia. Os pacientes com LC e LM apresentam uma alta produção de IFN- γ e TNF- α (Ribeiro-De-Jesus et al., 1998; Bacellar et al., 2002; Oliveira et al., 2014) entretanto, ao invés de controlar a infecção, desenvolvem ulcerações cutâneas e mucosas. Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LM e LC quando estimuladas com antígenos de *L. braziliensis in vitro* produzem baixa concentração de IL-10 e a adição exógena dessa citocina não modula a produção de IFN- γ e TNF- α nesses pacientes (Bacellar et al., 2002). Embora IL-10 seja expressa em células da lesão de pacientes com LM e LC, as células da lesão mucosa expressam menos receptor de IL-10 do que células da lesão cutânea (Faria et al., 2005). Existe uma correlação direta entre a frequência de células T CD4⁺ que expressam IFN- γ e TNF e o tamanho da úlcera (Antonelli et al., 2005). O uso da pentoxifilina (inibidor da produção de TNF- α) associado ao antimônio (droga de primeira escolha no tratamento das leishmanioses), cura pacientes com leishmaniose mucosa que são refratários ao tratamento com antimonial (Lessa et al., 2001) e essa associação é mais efetiva e diminui o tempo de cura quando comparado ao uso do antimonial sozinho no tratamento da leishmaniose cutânea (Machado et al., 2007).

Na LC há maior frequência de células TCD4⁺ do que células TCD8⁺ e os linfócitos T CD4⁺ são considerados as principais células produtoras de IFN- γ em humanos (Kemp et al., 1999; Bottrel et al., 2001). No processo de cura há um declínio de células T CD4⁺ e um aumento de células T CD8⁺ (Da-Cruz et al., 2002). Entretanto, vários estudos tem mostrado que células T CD8⁺ estão envolvidas na patogênese da doença (Faria et al., 2009; Novais et al., 2013; Santos et al., 2013; Cardoso et al., 2015).

IV.5 O PAPEL DAS QUIMIOCINAS NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

O recrutamento inicial da população celular no primeiro momento da infecção parece ter papel importante no desenvolvimento da doença. A maioria das quimiocinas, que são um sub-grupo de citocinas, atraem neutrófilos e monócitos enquanto CXCL9 (monoquina induzida por IFN- γ) e CXCL10 (proteína indutora de IFN- γ), estão envolvidas no recrutamento e ativação de células T (Ritter & Korner, 2002).

Durante esta fase de recrutamento celular, as quimiocinas tem uma importância fundamental na atração dos subtipos de leucócitos para o sítio da infecção e também de estimulá-los (Rot & von Andrian, 2004). Vários estudos tem mostrado o papel dessas moléculas em outras doenças infecciosas e inflamatórias (Guerreiro et al., 2006; Gong et al., 2015; Khaiboullina et al., 2015; Bielecki et al., 2015).

Além do recrutamento dos leucócitos, o papel das quimiocinas na infecção por *Leishmania* inclui participação na imunidade mediada por células, ativação celular e atividade leishmanicida (Teixeira et al., 2006). Diferentes padrões de quimiocinas estão associados às várias formas clínicas da leishmaniose tegumentar e isso sugere uma importante participação dessas moléculas na patogênese da leishmaniose. Por exemplo, as lesões de pacientes com leishmaniose cutânea localizada auto curável apresentam alta expressão de CCL2, CXCL9 e CXCL10 (Ritter & Körner, 2002). Neutrófilos de pacientes com LC, infectados com *L. braziliensis* produzem mais CXCL8 e CXCL9 quando comparados com neutrófilos de controles sadios (Conceição et al., 2016). Em uma área de transmissão de *L. donovani* a produção de CXCL9 e CXCL10 foi menor nos indivíduos com infecção assintomática que nos pacientes com leishmaniose visceral (Hailu et al., 2004). CCL2, uma quimiocina que atrai monócitos e células TCD4⁺

(Penido et al., 2003) também está envolvida na ativação de macrófagos para matar *Leishmania* (Brandonisio et al., 2002). Entretanto, um estudo mostrou que macrófagos de pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa infectados com *L. braziliensis* produzem mais CXCL9 e CCL2 que macrófagos de indivíduos com infecção subclínica, sugerindo que essas moléculas participam também da forte resposta inflamatória observada na LTA (Giudice et al., 2012).

IV. 6. INFECÇÃO SUB-CLÍNICA POR *L.braziliensis*

Infecção subclínica ou assintomática já foi documentada em indivíduos que vivem em áreas endêmicas de leishmaniose desde os anos 60 (González & Biagi, 1968). Guerra et al., (1985) buscaram entender um pouco mais as infecções subclínicas e reavaliar os métodos diagnósticos para detecção deste tipo de infecção. A infecção subclínica por *Leishmania* também foi mostrada em áreas endêmicas de transmissão de *Leishmania infantum*, agente que causa a leishmaniose visceral (Badaró et al., 1986). Estudos anteriores demonstraram que 10 a 15% dos indivíduos saudáveis que vivem em uma área endêmica não tinham história prévia de LC, mas, apresentaram a RM positiva para *L. braziliensis* (Follador et al., 2002; Bittar, et al., 2007; Schnorr, et al., 2012). Nestes indivíduos, o desenvolvimento de uma resposta imune adequada parece contribuir para controlar a replicação do parasita e manter a integridade do tecido.

A evidência de infecção nos indivíduos sem história de doença pode ser demonstrada através do teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* que é muito utilizado para determinar a prevalência de exposição à *Leishmania* (Guerra et al., 1985; Weigle et al., 1991; Follador et al., 1999; Camera et al., 2006). O teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno solúvel de *Leishmania* têm uma alta sensibilidade

e especificidade para o diagnóstico de LC e por isso é o principal teste diagnóstico usado em áreas endêmicas para identificar indivíduos expostos ao parasita na ausência de doença (Davies et al., 1995; Bittar, et al., 2007; Gomes-Silva, et al., 2007; Schnorr, et al., 2012). Alguns autores também usam como testes diagnósticos o cultivo de células mononucleares *in vitro* e a imunofluorescência indireta (Curti et al., 2011; Sarkari et al., 2014) e PCR (Polymerase Chain Reaction) (Weirather et al., 2011; Conter et al., 2015; Chilama et al., 2015). Adicionalmente, a infecção subclínica também pode ser caracterizada pela produção de IFN- γ após estímulo com o antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) (Schnorr, et al., 2012). Um estudo realizado em uma área de transmissão de *L. major* observou que nos indivíduos assintomáticos a resistência à doença era proporcional ao tamanho da RM e isso constitui um modo relativamente frequente de imunização natural. Nesse estudo a proporção de infecção assintomática para doença foi 3:1 (Salah, et al., 2005). Foi encontrada 98% de concordância entre a RM e resposta proliferativa linfocitária *in vitro* ao antígeno de *Leishmania*, em indivíduos residentes de uma área endêmica para *L. major* sem história prévia de LC. Nos indivíduos assintomáticos a resposta imune celular foi similar, em intensidade, à observada nos pacientes curados (Sassi et al., 1999).

Como ocorre em outras doenças infecciosas e parasitárias, o estudo da resposta imune em indivíduos que montam resposta à infecção e não desenvolvem a doença aparente permite entender os mecanismos imunológicos de proteção contra infecção. Comparados com pacientes com leishmaniose cutânea, os portadores de infecção subclínica apresentam uma menor produção de IFN- γ e TNF- α , sugerindo que essa resposta imune modulada tem a capacidade de controlar a infecção sem causar patologia (Follador et al., 2002; Novoa et al., 2011).

Os indivíduos residentes numa área endêmica de sabida transmissão do parasito são considerados susceptíveis à infecção. Apesar do controle da infecção, os indivíduos sub clínicos podem ser considerados um reservatório da infecção no hospedeiro e podem contribuir para a endemicidade e transmissão da doença (Chilama et al., 2015). Indivíduos com infecção subclínica tem baixa produção de citocinas pró-inflamatórias e conseguem controlar a infecção possivelmente, pela sua capacidade intrínseca para criar um equilíbrio entre citocinas imunorreguladoras (IL-10) e citocinas efetoras (IFN- γ), que conduzem à destruição do parasita sem produzir danos no tecido da pele (Follador et al., 2002; Bittar et al., 2007). Estes indivíduos, apresentam baixa proliferação linfocitária *in vitro* quando estimulados com antígeno de *Leishmania* e menor produção de IFN- γ do que indivíduos curados. Entretanto, apresentam maior produção de IL-10 (Bittar, et al., 2007). Bahrami et al., (2014) mostraram que indivíduos assintomáticos expressam mais FOXP3 do que indivíduos curados sugerindo que células T regulatórias podem contribuir na manutenção da resposta imune contra o parasito em caso de reinfecção. *In vitro*, macrófagos de indivíduos assintomáticos são menos susceptíveis à infecção por *L. panamensis* do que os macrófagos de indivíduos curados (Robledo et al., 1994) apresentando proliferação linfocitária menor do que nos indivíduos com infecção recorrente (Bosque et al., 2000) Na infecção por *L. braziliensis*, macrófagos de indivíduos subclínicos controlam o crescimento do parasita de forma mais eficiente que macrófagos de pacientes com LC (Giudice et al., 2012). Além disso, a habilidade de produzir uma resposta rápida por células NK em indivíduos não expostos pode influenciar no desfecho da infecção (Maasho, et al., 1998).

V. HIPÓTESE

Considerando os vários estudos que apostam para o controle da infecção por *Leishmania* via mecanismo da resposta imune inata, nossa hipótese é que a resposta imune inata de indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis* está associada com proteção contra o desenvolvimento de leishmaniose cutânea.

VI. MATERIAL E MÉTODOS

VI.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E DESENHO EXPERIMENTAL

VI.1.1 Identificação de casos

a) **Infecção subclínica (SC):** Foram considerados como indivíduos com infecção subclínica os familiares de pacientes com leishmaniose cutânea residentes no mesmo domicílio que apresentavam o teste positivo de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* e/ou produção *in vitro* de IFN- γ antígeno específica sem evidência de leishmaniose cutânea, ou seja, indivíduos com RM⁺ e/ou IFN- γ ⁺ (Schnorr et al., 2012).

b) **Leishmaniose cutânea (LC):** Pacientes apresentando lesão ulcerada na pele, sem evidência de envolvimento da mucosa. O diagnóstico foi realizado pela detecção do parasito através da cultura do aspirado da lesão, ou pelo achado da lesão típica associado ao teste positivo de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania*

(Reação de Montenegro), histopatologia compatível com leishmaniose tegumentar ou através da Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa (qPCR) de biópsias das amostras de lesões.

VI.2 ÁREA ENDÊMICA DE CORTE DE PEDRA, BAHIA

A vila de Corte de Pedra pertence ao município de Presidente Tancredo Neves, que está localizado no Sudeste do estado da Bahia, a 280 km de Salvador, capital da Bahia. Nesta área está localizado o Posto de Saúde que atende uma população de aproximadamente 10 municípios. Médicos vinculados ao Serviço de Imunologia do complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Com-HUPES) da Universidade Federal da Bahia visitam esta região e dão assistência aos indivíduos acometidos pela leishmaniose. O vilarejo também recebe apoio de agentes de saúde, residentes na vila, que são treinados para visitar famílias e recrutar pacientes para realização de pesquisas e acompanhamento clínico.

VI.3 DESENHO DE ESTUDO

Em Janeiro de 2010, ano zero, foi iniciada uma coorte de familiares residentes no mesmo domicílio de 76 pacientes diagnosticados com LC (casos index). Esses indivíduos foram identificados um ano antes do início do estudo e residiam até 30 km de distância do Posto de Saúde de Corte de Pedra. Os contatos familiares (CF) não apresentavam evidência atual ou pregressa da doença e estes indivíduos foram acompanhados até 2015, ano 5 (cinco), com a finalidade de estudar a resposta imunológica e a incidência de LC (FIGURA 1).

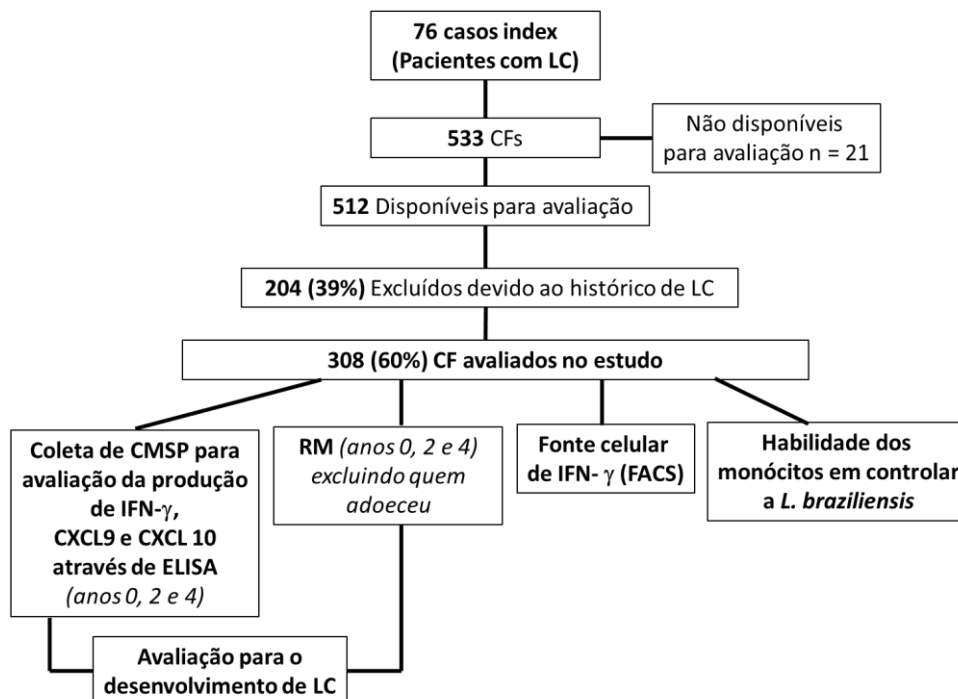


FIGURA 1. Desenho de estudo e estudos imunológicos de uma coorte de contatos familiares (CF) em uma área endêmica para a *L. braziliensis* e os estudos imunológicos realizados. Os estudos imunológicos foram realizados em anos 0, 2, 4, e o desenvolvimento de Leishmaniose cutânea (LC) foi monitorada durante toda a duração do estudo da coorte. Siglas: CMSP (Células mononucleares do sangue periférico); RM (Reação de Montenegro); FACS (Fluorescence-activated Cell Sorting).

Foram identificados 533 contatos familiares (CF). Destes, 225 foram excluídos do estudo porque 204 tinham uma história prévia de LC e em 21 indivíduos a coleta não pode ser realizada porque eles não estavam presentes ou não assinaram o Termo de Consentimento. Os 308 participantes receberam um cartão de identificação. Foi aplicado um questionário com informações sobre aspectos demográficos e ambientais (ANEXO 1). Também foi feito um exame clínico com a finalidade de identificar cicatrizes compatíveis com LC e úlceras cutâneas típicas da doença. Os indivíduos foram orientados a procurar atendimento médico no Posto de Saúde de Corte de Pedra se desenvolvessem linfadenopatia (popularmente chamada de íngua), lesões papulosas ou a úlcera cutânea propriamente dita. Além disso, foi realizada uma visita anual, a casa

de todos os participantes, para busca ativa de indivíduos que não tenham tido LC e não compareceram ao Posto de Saúde. Os indivíduos que apresentavam sintomas da doença tiveram o diagnóstico confirmado pelo isolamento do parasita ou PCR positivo para *L. braziliensis* (Weirather et al., 2011).

No momento da entrada no estudo (ano zero) a reação de Montenegro e estudos imunológicos *in vitro* foram realizados para detectar a produção de citocinas e quimiocinas. Estes estudos imunológicos foram repetidos no ano dois e no ano quatro. Em um número limitado de CF que apresentaram uma RM negativo, mas tinham capacidade de produzir IFN- γ e que permaneceu livre da doença, a fonte produtora do IFN- γ foi determinada. A capacidade dos monócitos em controlar a infecção por *L. braziliensis* também foi avaliada em CF com evidência de resposta imune que permaneceram livres de doença e em CF que desenvolveram LC. Dos 308 CF, 19 realizaram estudos imunológicos apenas nas duas primeiras avaliações e 15 possuem dados imunológicos apenas na primeira avaliação por causa da recusa de se submeter a nova coleta de sangue (n = 21) ou devido à mudança para outra cidade (n = 13). Nestes casos, a informação sobre desenvolvimento de LC foi obtido por contato telefônico. Nenhum destes 34 indivíduos desenvolveram LC durante o seguimento.

VI. 4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

1. Indivíduos familiares de pacientes com LC sem diagnóstico de LC ativa ou evidência de cicatriz de LC pregressa;
2. Indivíduos com idade entre 2 e 60 anos;
3. Aceitação de participar do estudo após a leitura do termo de consentimento livre e esclarecido

VI. 5 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

1. Indivíduos que realizaram a reação de Montenegro até três meses antes da data de coleta de sangue;

VI.6 IDENTIFICAÇÃO DE EXPOSIÇÃO À INFECÇÃO POR *L.braziliensis*.

VI.6.1 Avaliação da produção de IFN- γ antígeno-específica

Em cada visita foi coletado sangue periférico (10 ml) heparinizado antes da realização do teste de Montenegro. Aproximadamente 6h após a coleta, alíquotas de 1 ml de sangue total foi dispensada em placas de cultura de 24 poços (Thechno Plastic Productcs AG). As culturas foram deixadas sem estímulo (meio) ou foram estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como controle positivo da cultura, o sangue total também foi estimulado com 50 μl do mitógeno Phitohemaglutinina (PHA). As amostras foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ durante 72 horas. Após esse período os sobrenadantes (300-400 μL de plasma) foram coletados, e as amostras foram armazenadas a -20°C. A produção de IFN- γ neste sobrenadante foi realizada através de técnica imunoenzimática (ELISA), utilizando reagentes comercialmente disponíveis (BD OpTEIA, San Diego, CA). Uma curva padrão foi utilizada para expressar os resultados em pg /ml.

VI.6.2 Teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* (Reação de Montenegro)

O teste *in vivo* de hipersensibilidade tardia ou reação de Montenegro (RM) foi realizado após a coleta do sangue, para evitar a possível influência do antígeno utilizado no teste de hipersensibilidade na resposta imune determinada *in vitro*. Para o teste de hipersensibilidade tardia foi utilizado o antígeno solúvel de *L. braziliensis*, obtido de forma semelhante ao descrito anteriormente com *L. amazonensis* (Reed et al., 1986). O antígeno foi ajustado à concentração de 25mg/mL e 0,1 ml do preparado foi injetado intradermicamente no antebraço. Após 48-72 horas o maior diâmetro de induração foi medido. A reação foi considerada positiva quando o diâmetro foi maior ou igual a 5 mm.

VI.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS

Nas amostras de plasma armazenadas, CXCL9 e CXCL10 foram quantificadas através da técnica imunoenzimática (ELISA), utilizando reagentes comercialmente disponíveis (BD OpTEIA, San Diego, CA). Uma curva padrão foi utilizada para expressar os resultados em pg/ml. No caso da ausência de evidência de exposição a *L. braziliensis* em algum dos anos coletados, os últimos valores das quimiocinas disponíveis (a última coleta) foram analisados. O mesmo foi feito para os indivíduos sem evidência de exposição a *L. braziliensis*.

VI.8 AVALIAÇÃO DA FONTE CELULAR PRODUTORA DE IFN- γ EM INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS E PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA (LC)

VI.8.1 Separação de células mononucleares e avaliação da produção intracelular de IFN- γ

As células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de cinco indivíduos SC e dez pacientes com leishmaniose cutânea foram obtidas a partir de sangue total heparinizado e separadas por gradiente de densidade utilizando de Ficoll Paque™ PLUS (GE Healthcare). Após lavagens as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) suplementado com 10% de soro AB humano Rh⁺ (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) e antibióticos. As células (5×10^5 / ml) foram estimuladas com SLA (5 μ g / ml) e cultivadas a 37° C, em atmosfera de CO₂ a 5% durante 6 horas. A fim de inibir o transporte de proteínas, 25 μ M/ml de monensina (Sigma) foi adicionada durante as últimas 4-5 horas de cultura. As células foram então coletadas, marcadas com anticorpo anti-humano CD56 conjugado com fluorocromo (PerCP-Cy5.5), CD3 (APC), CD8 (PE) e CD4 (FITC) (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) durante 20 minutos, lavadas, fixadas e permeabilizadas como anteriormente descrito (Antonelli et al., 2005). As células foram marcadas para IFN- γ (Pe-Cy7) durante 30 minutos, lavadas com tampão Perm/wash e ressuspensas em PBS (pH 7,2) mais 1% de albumina bovina. Um mínimo de 500.000 eventos foram avaliados para cada amostra. O citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Pharmingen) foi usado e a análise foi realizada utilizando software FlowJo (Tree Star).

VI.9 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* EM CULTURA DE MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS E PACIENTES COM LC

Um isolado de *L. braziliensis* (LTCP 11245) foi cultivado em meio Schneider suplementado com soro bovino fetal (SBF). CMSP totais (1×10^6 cells / tubo) de indivíduos SC (n=7) e de pacientes com LC (n=7) foram infectadas com promastigotas na fase estacionária de *L. braziliensis* na razão de 5:1 células e incubados a 37° C in 5% CO₂. Após 2 horas, parasitos extracelulares foram removidos após centrifugação. As células foram colocadas em meio RPMI 1640 suplementado com SBF e incubadas por mais 24, 48 e 72 horas. Após esse período de tempo, a porcentagem de monócitos infectados e o número de parasitas intracelulares foram determinados por microscopia óptica em lâminas de citocentrífuga, coradas com May-Grunwald-Giemsa. Para quantificar parasitas viáveis em monócitos infectados após 72h, o meio de cultura foi substituído por 0.5mL do meio Schneider (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SBF, e cultivado por 5 dias adicionais. Após esse período o número de promastigotas viáveis foi avaliado nos sobrenadantes das culturas em câmara de Neubauer.

VI.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão ou mediana (Q1, Q3). O teste não paramétrico de Mann Whitney foi utilizado para comparar as variáveis contínuas entre os dois grupos. O teste de ANOVA e o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre três grupos. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar as

proporções. As correlações foram realizadas após transformação logarítmica dos dados e utilizou-se o método de Spearman. A análise da concordância entre a RM e a produção de IFN- γ foi realizada através do cálculo da estatística Kappa (κ) de acordo com intervalo de confiança de 95% utilizando a calculadora Vassarstats (disponível em <http://vassarstats.net/kappa.html>). As análises foram realizadas utilizando o software Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), IBM SPSS Statistics 20 e o Stata 2010 (College Station, TX: StataCorp LP). Um valor $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para determinar a incidência de LC foi utilizado a análise de pessoa-ano que leva em conta o número de pessoas observadas, bem como, a duração do período de observação de cada indivíduo. Além disso, calculou-se o risco relativo (MedCalc Software 15.8).

VI.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho faz parte de um estudo de coorte cujo título é “Incidência de leishmaniose cutânea em familiares de pacientes com leishmaniose e avaliação da resposta imune nestes indivíduos”. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Maternidade Climério de Oliveira com o Parecer Nº 087/2009 – 16/09/09 (ANEXO 3). A voluntariedade na participação nesse projeto se fez mediante assinatura dos participantes ou de seus representantes legais, do termo de consentimento (ANEXO 2).

VII. ARTIGO 1

“Immunological markers of protection in *Leishmania braziliensis* infection: A five years cohort study.” The Journal of Infectious Diseases [aceito para publicação, *vide* Normas de Publicação no **ANEXO 4** e carta de aceitação, no **ANEXO 5**).

Immunologic Markers of Protection in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection: A 5-Year Cohort Study

Aline C. Muniz,^{1,2} Olívia Bacellar,^{1,2,3} Ednaldo Lima Lago,¹ Augusto M. Carvalho,^{2,4} Pedro Paulo Carneiro,^{1,2} Luiz Henrique Guimarães,¹ Paulo N. Rocha,^{2,5} Lucas P. Carvalho,^{1,2,3,4} Marshall Glesby,⁶ and Edgar M. Carvalho^{1,2,3,4}

¹Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Federal University of Bahia, ²Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Bahia School of Medicine, ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais, ⁴Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, and ⁵Department of Medicine and Diagnostic Support, Federal University of Bahia School of Medicine, Brazil; and ⁶Weill Cornell Medical College, New York, New York

Background. The control of *Leishmania braziliensis* by individuals with subclinical infection (SC) are unknown.

Methods. A cohort of 308 household contacts (HCs) of patients with cutaneous leishmaniasis (CL) was established in 2010 in an endemic area and followed up for 5 years. Whole-blood cultures stimulated with soluble *Leishmania* antigen and a *Leishmania* skin test (LST) were performed in years 0, 2, and 4. The identification of the lymphocyte subsets secreting interferon (IFN) γ and the ability of monocytes to control *Leishmania* were determined.

Results. During follow-up, 118 subjects (38.3%) had evidence of *L. braziliensis* infection. Of the HCs, CL was documented in 45 (14.6%), 101 (32.8%) had SC infection, and 162 (52.6%) did not have evidence of exposure to *L. braziliensis*. The ratio of infection to disease was 3.2:1. IFN- γ production, mainly by natural killer cells, was associated with protection, and a positive LST result did not prevent development of disease. Moreover, monocytes from subjects with SC infection were less permissive to parasite penetration and had a greater ability to control *L. braziliensis* than cells from patients with CL.

Conclusions. Protection against CL was associated with IFN- γ production, negative LST results, impaired ability of *Leishmania* to penetrate monocytes, and increased ability to control *Leishmania* growth.

Keywords. subclinical leishmaniasis; household contacts; *Leishmania braziliensis*; cutaneous leishmaniasis; IFN- γ ; *Leishmania* skin test.

Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common clinical presentation of tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* [1]. The lesions are typically characterized by a single ulcer with raised borders predominantly located in the lower limbs. The delayed-type hypersensitivity test to soluble *Leishmania* antigen (SLA), the *Leishmania* skin test (LST), has a high sensitivity for the diagnosis of CL and is also used to identify individuals exposed to the parasite in the absence of disease [2–4]. Of healthy individuals without a history of CL living in endemic areas, 10%–15% have a positive LST result [3, 5]. More recently, we showed that in vitro interferon (IFN) γ production increases the sensitivity to detect exposure to *L. braziliensis* [6]. Individuals with a positive LST result or evidence of IFN- γ production without clinical manifestations of CL are classified as having subclinical (SC) *L. braziliensis* infection [6–8].

The main mechanism of *Leishmania* killing is macrophage activation induced by IFN- γ [9–11]. The importance of a T-helper 1 immune response to control parasite growth and dissemination

is well documented in leishmaniasis [12, 13]. However, in *L. braziliensis* infections, the parasite persists, and both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell activation have been linked to disease [14, 15]. There is a direct correlation between the frequency of CD4⁺ T cells expressing IFN- γ and tumor necrosis factor (TNF) and the size of the ulcer [14]. Moreover, IFN- γ and TNF levels are higher in mucosal leishmaniasis than in CL [16]. Finally, there is a direct correlation between the frequency of CD8⁺ T cells and CD8⁺ T cells expressing granzyme and the intensity of the inflammatory response in CL ulcers [17]. Because individuals with SC infection produce less IFN- γ , TNF, and granzyme B than patients with CL [18], one possibility is that control of *L. braziliensis* infection in these subjects is related to the innate immune response.

To better understand the immunologic factors involved in the protection against disease due to *L. braziliensis*, we established a cohort in 2010 of household contacts (HCs) of patients with CL who had no personal history of CL. In the present study, we determined the incidence of CL and identified host factors associated with SC infection or CL in subjects exposed to *L. braziliensis*.

METHODS

Area of Study and Establishment of a Cohort

This study was conducted in the village of Corte de Pedra, located in the southeast of Bahia, Brazil. This is a well-known area of *L. braziliensis* transmission that registers the highest incidence

Received 8 March 2016; accepted 5 May 2016.

Correspondence: E. M. Carvalho, Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia 40170-110, Brazil (imuno@ufba.br).

The Journal of Infectious Diseases®

© The Author 2016. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/infdis/jiw196

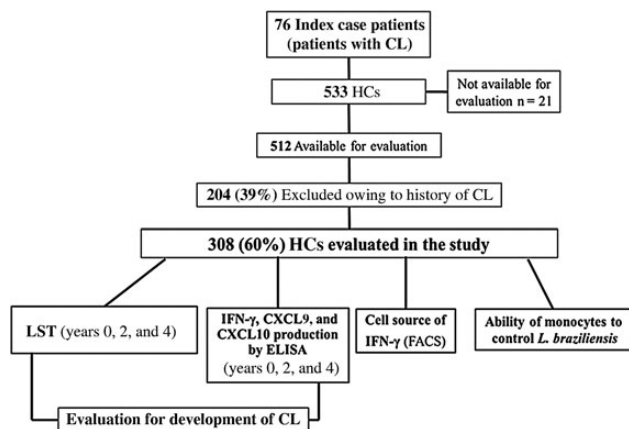


Figure 1. Study design of a cohort of household contacts (HCs) in a *Leishmania braziliensis* endemic area and immunologic studies performed. Immunologic studies were performed in years 0, 2, 4, and development of cutaneous leishmaniasis (CL) was monitored during the whole duration of the cohort study. Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FACS, fluorescence-activated cell sorting; IFN, interferon; LST, *Leishmania* skin test.

rates of CL in Brazil. The cohort was established in January 2010, with HCs of 76 index case patients with a diagnosis of CL, within 1 year before the initiation of the study. At that time, 533 HCs were identified. Of those, 225 were excluded from the study, 204 with a history of CL and 21 who could not be located. Therefore, 308 individuals without a history of CL participated in this study (Figure 1).

Experimental Design

The 308 participants received an identification card, a history of CL was obtained, and a physical examination was performed, looking for cutaneous ulcers and scars indicative of CL. Subjects were instructed to seek medical attention at the Health Center of Corte de Pedra if lymphadenopathy, papular lesions, or cutaneous ulcers developed. In addition, 1 visit was performed annually for active surveillance of CL. Those suspected of having CL had the diagnosis confirmed by parasite isolation or a positive polymerase chain reaction result for *L. braziliensis* [19].

At study entrance, LST and in vitro cytokine production were performed. These immunologic studies were repeated at years 2 and 4. We determined the source of IFN- γ in a convenience sample of a limited subset of HCs who produced IFN- γ and remained free of disease. In addition, we evaluated the ability of the monocytes to control *L. braziliensis* in a subset of HCs with evidence of immune response that remained free of the disease and in HCs who developed CL. Of the 308 HCs, 19 underwent immunologic studies only in the first 2 evaluations, and 15 had immunologic data only for the first evaluation because of refusal to undergo blood collection ($n = 21$) or relocation to another town ($n = 13$). Patients who relocated were contacted by phone to inquire about the presence of CL lesions. CL developed in none of these 34 subjects during follow-up.

This research was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Bahia and the Weill Cornell Medical College Institutional Review Board. Informed consent was obtained from each participant or his or her parents.

LST and In Vitro Cytokine and Chemokine Production

The LST was conducted using SLA, as described elsewhere [20]. The reaction was considered positive when the diameter was ≥ 5 mm. For cytokine production, heparinized peripheral blood (10 mL) was collected immediately before the LST. Aliquots of 1 mL of whole blood were dispensed into a 24-well tissue plate. Cultures were left unstimulated or were stimulated with SLA at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and incubated at 37°C at 5% carbon dioxide (CO_2) for 72 hours. Plasma supernatants were collected and the levels of IFN- γ , interleukin 10, CXCL9, and CXCL10 were quantified by means of enzyme-linked immunosorbent assay, using commercially available reagents (BD OpTEIA). Results were obtained using the plate reader Emax (Molecular Devices) and expressed in picograms per milliliter.

Subjects were censored at the time of development of CL. If there was evidence of exposure to *L. braziliensis*, the last available chemokine values were analyzed. Similarly, the last available chemokine levels were analyzed for subjects without evidence of exposure to *L. braziliensis*.

Cell Culture of Peripheral Blood Mononuclear Cells and Flow Cytometry Analysis (Fluorescence-Activated Cell Sorting)

Peripheral blood mononuclear cells from 5 individuals with SC infection and 10 patients with CL were obtained by density gradient centrifugation using heparinized whole blood over Ficoll-Paque Plus medium (GE Healthcare). After washing, cells were resuspended in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (Gibco BRL) supplemented with 10% human AB Rh⁺ serum (Sigma Chemical Co) and antibiotics. Cells ($5 \times 10^5/\text{mL}$) were stimulated with SLA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and cultured at 37°C and 5% CO_2 for 6 hours. Monensin (Sigma) was added at 25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ during the last 4–5 hours of culture to inhibit protein transportation. Cells were then harvested, stained with fluorochrome-conjugated anti-human CD56, CD8, and CD4 antibodies (BD Biosciences) for 20 minutes, washed, fixed, and permeabilized, as described elsewhere [14]. Cells were stained for IFN- γ for 30 minutes, washed with Perm/Wash (BD Biosciences) buffer and resuspended in phosphate-buffered saline (pH 7.2) plus 1% bovine albumin. A minimum of 500 000 events were evaluated for each sample. A FACS Canto II flow cytometer (BD Pharmingen) was used, and analysis was performed using FlowJo software version X (Tree Star).

Evaluation of *L. braziliensis* Control by Monocytes

An isolate of *L. braziliensis* was cultured in Schneider medium supplemented with fetal bovine serum (FBS). Peripheral blood mononuclear cells (1×10^6 cells per tube) from individuals with SC infection and patients with CL were infected with *L. braziliensis* promastigotes in the stationary phase at a ratio of 5:1 cells and incubated at 37°C in 5% CO_2 . After 2 hours, extracellular

parasites were removed after centrifugation. The cells were placed in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium supplemented with FBS and incubated for another 24, 48, and 72 hours. After these periods of time, the percentage of infected cells and the number of intracellular parasites were determined by microscopic evaluation of 100 monocytes, after May-Grunwald-Giemsa staining from cytocentrifuge preparations. To quantify variable parasites in *L. braziliensis*-infected monocytes after 72 hours, the culture medium was replaced by 0.5 mL of Schneider medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS and cultured for 5 additional days.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean (standard deviation [SD]) or median (interquartile range). The Mann-Whitney test was used to compare continuous variables between 2 groups, and the Student *t* test and Kruskal-Wallis test to compare them among 3 groups. The Fisher exact test was used to compare proportions. Analyses were conducted using Prism 4 software (GraphPad) and IBM SPSS Statistics 20 software. Differences were considered statistically significant at $P < .05$. To determine the incidence of CL, we used person-year analysis, taking into account the number of persons observed as well as the duration of the observation period. We also calculated the relative risk (MedCalc software; version 15.8).

RESULTS

Demographic, Epidemiologic and Immunologic Features of HCs of CL Patients According to Disease Outcome

Of the 308 HCs, 45 developed CL, 101 had SC *L. braziliensis* infection, and 162 had no evidence of exposure to *L. braziliensis*.

Table 1 summarizes the demographic, epidemiologic, and immunologic features of the 3 groups of subjects. Subjects who developed CL were younger than the others groups and were predominantly students. Production of CXCL9 and CXCL10 in cultures stimulated with *L. braziliensis* was higher ($P < .005$) in those who had evidence of exposure to *L. braziliensis*, independent of the outcome of the infection.

Frequency of HCs Who Remained Free of Disease or Developed CL According to Positivity of the LST or IFN- γ Production

Figure 2 details the number of HCs with evidence of immune response based on a positive LST result or IFN- γ production, as well as the number who developed CL or remained free of disease. Of the 308 HCs followed up for 5 years, 118 (25.5%) had evidence of immune response, including 53 (17.2%) with a positive LST result, of whom 30 (56.6%) produced IFN- γ . We also found that 65 (25.5%) of the 308 HCs had evidence of IFN- γ production despite a negative LST result. Using both tests as evidence of *L. braziliensis* infection increased the likelihood of detecting exposure to *L. braziliensis* by 2.2-fold compared with using LST alone. Moreover, there was only a fair concordance between the 2 tests (kappa, 0.24; 95% confidence interval, .12-.35).

Of the 45 HCs (14.6%) who developed CL, 19 had CL in year 1, ten in year 2, nine in year 3, four in year 4, and three in year 5. Among those who developed CL, 8 (17.8%) had a positive LST result before developing signs of the disease. In contrast, only 2 HCs (3.0%) who produced IFN- γ despite a negative LST result went on to develop CL. The remaining 35 (18.4%) who developed CL had a negative LST result and did not produce IFN- γ .

Table 1. Demographic, Epidemiologic, and Immunologic Findings in Household Contacts (n = 308) of Patients With CL, According to the Development of CL or SC *Leishmania braziliensis* Infection^a

Variable	CL (n = 45)	SC Infection (n = 101)	Controls (n = 162)	<i>t</i>
Age, mean (SD), y	19 (9)	25 (15) ^{b,c}	20 (12)	0.017
Male sex, No. (%)	25 (56)	52 (52)	75 (47)	0.505
Occupation, %				
Agriculture	13	24	21	0.039
Domestic	16	32	22	
Students and others	71	45	58	
Time in the endemic area, mean (SD), y	20 (9)	25 (14) ^d	20 (11)	0.018
Chemokine data, median (IQR)				
CXCL9 (medium)	4976 (3000-14 941)*	5307 (2413-10 019)*	4228 (1864-7068)*	0.036
CXCL9 (SLA)	8912 (3252-26 158)*	11320 (5116-40 258)*	5257 (2772-8216)* ^{e,f}	<0.001
CXCL10 (medium)	407 (0-1764)*	591 (334-1067)*	634 (374-1279)*	0.285
CXCL10 (SLA)	713 (260-28 434)*	1203 (574-6189)*	784 (441-1622)* ^{g,h}	0.014

Abbreviations: CL, cutaneous leishmaniasis; IQR, interquartile range; SC, subclinical leishmaniasis; SD, standard deviation; SLA, soluble *Leishmania* antigen.

^a The Student *t* test was used to compare continuous variables, the Fisher exact test to compare proportions, and the Kruskal-Wallis test to compare chemokine values.

^b $P = .04$ for CL vs SC infection.

^c $P = .004$ for SC infection vs control.

^d $P = .005$ for SC infection vs control.

^e $P < .001$ for SC infection vs control.

^f $P = .03$ for CL vs control.

^g $P = .002$ for SC infection vs control.

^h $P = .004$ for CL vs control.

* The chemokine's values are expressed by pg/mL.

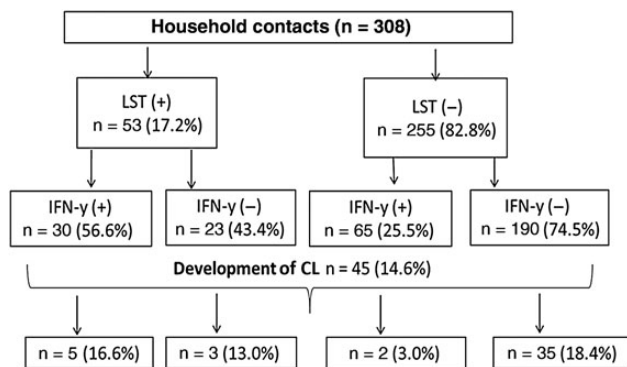


Figure 2. Development of cutaneous leishmaniasis (CL) or subclinical *Leishmania braziliensis* infection in household contacts of patients with CL. The data indicate the number of individuals who had evidence of immune response based on positivity of the *Leishmania* skin test (LST) and interferon (IFN) γ production during the 5 years of follow-up and the number of household contacts who developed CL. Parenthetical plus and minus signs denote positive and negative findings, respectively.

Incidence of Cutaneous Leishmaniasis According to the Immunologic Response to Leishmania Antigen

We calculated the incidence of CL according to the immune response to SLA: IFN- γ production, positive LST results, and both negative LST and negative IFN- γ results (Table 2). This analysis showed that although the risk of developing CL was similar in the LST-positive and LST-negative/IFN- γ -negative groups, the risk was reduced by 85% in those who had only IFN- γ production when compared with the group without evidence of immune response. When we compared the frequency of CL in HCs who were IFN- γ positive with those who were LST positive, HCs who were LST positive had a 6.2-fold greater chance of developing CL than those who had only IFN- γ production.

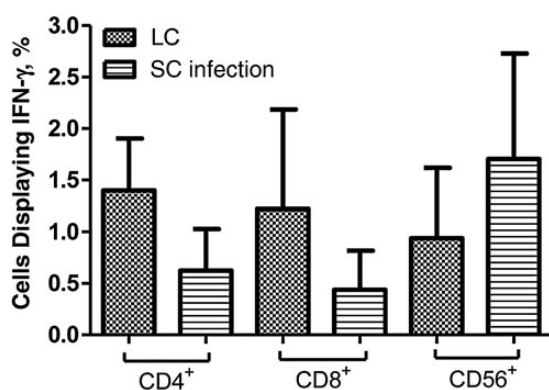


Figure 3. Cell source of interferon (IFN) γ production by flow cytometry. The graph shows the total frequency of CD4⁺, CD8⁺, and CD56⁺ cells from household contacts (n = 5) and patients with cutaneous leishmaniasis (CL) (n = 10) expressing IFN- γ after stimulation with soluble *Leishmania* antigen. Peripheral blood mononuclear cells from household contacts and patients with CL were stimulated with 5 μ g of soluble *Leishmania* antigen, and the frequency of cells expressing IFN- γ was determined by fluorescence-activated cell sorting. Abbreviation: SC, subclinical.

Analysis of Cell Source of IFN- γ

Flow cytometry analysis was conducted to determine the source of IFN- γ in subjects who developed SC infection and belonged to the IFN- γ -positive/LST-negative group and in patients with CL (Figure 3). The main sources of IFN- γ in subjects with SC infection were natural killer (NK) cells (1.7%) followed by CD4⁺ T (0.62%) cells and CD8⁺ T cells (0.43%); in patients with CL, the main sources were CD4⁺ T cells (1.4%), followed by CD8⁺ T cells (1.2%) and NK cells (0.94%).

Ability of Monocytes From Individuals With SC Infection to Control *L. braziliensis* Infection

The monocytes from individuals with SC infection and patients with CL were infected with *L. braziliensis*, and the number of infected cells and the parasite load were evaluated using optical microscopy (Figure 4). The mean (SD) percentages of infected cells were similar after 2 hours of infection in both groups (55 \pm 15% in SC infection and 47 \pm 17% in CL). However, there was a significant decrease in the mean (SD) frequency of infected monocytes from individuals with SC infection (35 \pm 8.6% [$P < .05$] and 12 \pm 4% [$P < .01$] after 24 and 72 hours, respectively). In cells from patients with CL there was no difference ($P > .05$) in the mean (SD) frequency of infected monocytes at 24 hours (55 \pm 22.5) and 48 hours (63 \pm 28). At 72 hours there was a decrease ($P < .05$) in the frequency of infected cells (29 \pm 7) (Figure 4A). To assess whether the decrease in the parasite load was related to *Leishmania* killing, we evaluated the viability of promastigotes in culture of infected monocytes from patients with CL and individuals with SC infection. The mean (SD) number of motile promastigotes in Schneider medium was higher in lysed monocytes from patients with CL (23 \pm 6.4) than in those from subjects with SC infection (9.6 \pm 16); $P < .01$.

Although the percentages of infected cells were similar in the 2 groups after 2 hours of infection, the mean (SD) number of amastigotes per 100 cells at 2 hours in monocytes from individuals with SC infection was lower than that in patients with CL (55 \pm 15 vs 175 \pm 82, respectively; $P < .05$). Moreover, although in monocytes from subject with SC infection the number of amastigotes per 100 cells decreased significantly at 24 and 48 hours, in patients with CL there was a slight increase in the number of parasites in this period of time (Figure 4B).

DISCUSSION

Understanding how the infections behave in naturally exposed individuals who do not develop disease is crucial to determine the mechanisms behind the control of the infection and may contribute to vaccine development. Herein, we showed that evidence of both innate and adaptive immune response are markers of exposure to *L. braziliensis*, but control of the infection was due to the innate immune response. We extend our previous observation that IFN- γ production supplements the LST to detect exposure to infection, showing that the addition of measuring IFN- γ production to the LST increased the detection of

Table 2. Incidence Rates and Relative Risk of CL According to the Host's Immune Response in a Cohort of Household Contacts of Patients With CL

Group	Incidence Cases of CL	Person-Years of Observation	Incidence Rate per 100 Person-Years (95% CI)	Relative Risk (95% CI) ^a
LST positive	8	138	5.79 (2.50–11.42)	0.96 (.38–2.10)
LST negative and IFN- γ positive	2	214	0.93 (.11–3.37)	0.15 (.02–.58)
LST and IFN- γ negative	35	578	6.05 (4.21–8.42)	...

Abbreviations: CI, confidence interval; CL, cutaneous leishmaniasis; IFN, interferon; LST, *Leishmania* skin test.

^a Relative risks were calculated using the group with both negative LST and negative IFN- γ findings as the reference group (denominator).

L. braziliensis infection by 2.2-fold. The ratio of infection to disease was 3.2:1. Development of CL was more frequent among younger subjects, who were predominantly students. Furthermore, protection against the development of CL was associated with IFN- γ production rather than with a positive LST result. We also found that monocytes play a key role in the control of *L. braziliensis* infection. NK cells were the major source of IFN- γ in individuals with SC infection, and monocytes from these subjects were less permissive to the infection and control *Leishmania* growth more effectively than cells from those who developed CL.

In an area of *Leishmania major* transmission, it has been shown that a positive LST result was associated with a decrease in the incidence of CL [21]. In the current study, we showed that the incidence rate of CL in individuals who had a positive LST result is 6.2 times higher than the rate in those who had only IFN- γ production, indicating that evidence of IFN- γ production reduced the risk of developing CL by 85%. So, IFN- γ production early in the infection may participate in the control of parasite growth and thereby prevent the development of CL.

Several studies have shown that IFN- γ participates in the activation of phagocytic cells, inducing parasite killing [22, 23], but there are several cell sources of IFN- γ [18, 24]. We found that all 3 T-cell subsets, CD56⁺, CD4⁺ and CD8⁺, produced this cytokine but CD3⁻CD56⁺ (NK) cells were the main source of IFN- γ in subjects exposed to *L. braziliensis* who did not develop CL. Although in patients with CL the majority of cells expressing IFN- γ were CD4⁺ and CD8⁺ T cells, the CD3⁻CD56⁺ (NK cells) were the main source of IFN- γ in subjects exposed to *L. braziliensis* who did not develop CL. IFN- γ production may have a dual role in *L. braziliensis* infection. In patients with CL, there is a correlation between the frequency of CD4⁺ cells producing IFN- γ and lesion size [14]. Moreover IFN- γ levels are higher in CL than in SC infection [3, 25]. Consequently it is likely that early in the infection IFN- γ production is related to protection, whereas in the late phase it is associated with disease. In CL due to *L. braziliensis*, virtually all patients have positive LST results and produce IFN- γ in vitro. The documentation that NK cells are the major source of IFN- γ in SC infection may also explain the only fair concordance between LST results and IFN- γ production in these subjects. In this setting the LST response may be related to T cells, whereas IFN- γ is produced by NK cells.

The killing of *Leishmania* is mediated by IFN- γ activated macrophages or cytotoxicity induced by CD8⁺ T cells or NK cells [26–29]. However, in CL, although CD8⁺ T cells induce apoptosis of infected monocytes, *Leishmania* killing is impaired [18, 30]. NK cells may be inflammatory, regulatory, and cytotoxic. Therefore, studies should be designed to evaluate whether, in addition to being an important source of IFN- γ in SC, NK cells from these subjects have the ability to kill *L. braziliensis*.

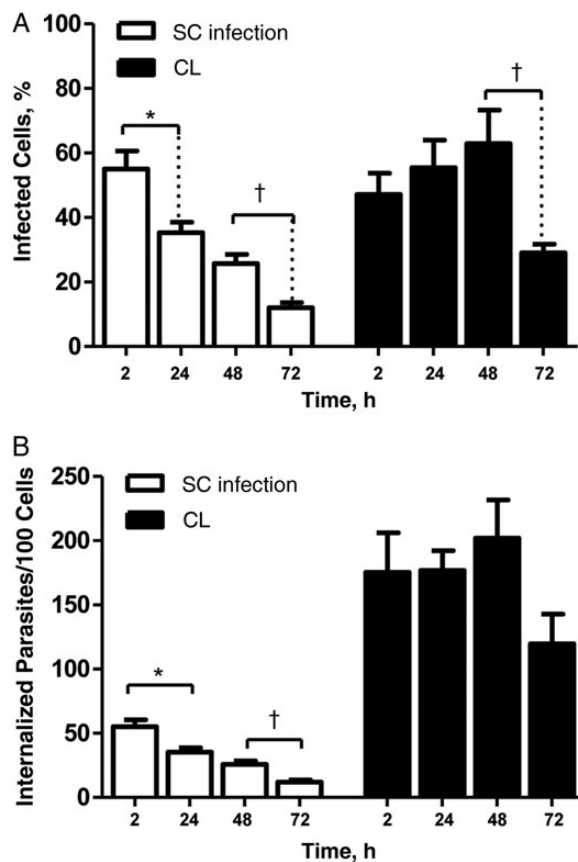


Figure 4. Phagocytosis and the ability to control *Leishmania braziliensis* by monocytes from individuals with subclinical (SC) infection. Monocytes from 7 individuals with SC infection and 7 patients with cutaneous leishmaniasis (CL) were infected with *L. braziliensis* at a 5:1 ratio at different times. The number of infected cells (A) and the number of intracellular parasites (B) were determined by microscopic evaluation after May-Grunwald-Giemsa staining from cytocentrifuge preparations. Data are summarized as means and standard deviations. * $P < .05$; † $P < .01$ (Mann-Whitney test).

Leishmania induces a potent inflammatory response in macrophages. In a previous study, cytokine production and macrophage killing of *L. braziliensis* were compared between HCs with SC infection and patients with CL. Macrophages from subjects with SC infection were less inflammatory and have more ability to kill *Leishmania* than cells from patients with CL [31]. Moreover macrophages from individuals with SC infection are less permissive to *Leishmania* penetration than cells from patients with recurrent CL [32], and in the current study we show that, although the frequencies of monocytes infected by *L. braziliensis* were similar in SC infection and in CL, there was a significant decrease in the percentage of infected cells at all time points. The low number of amastigotes 2 hours after infection indicates a decreased ability of *L. braziliensis* to penetrate in monocytes from individuals with SC infection. After 72 hours of infection there was a decrease in the frequency of infected cells in patients with CL, but this was probably due to the death of the cells and release of viable parasites.

This study has several limitations. For simplicity, we analyzed only 1 chemokine value per subject rather than using survival analyses methods to incorporate the longitudinal data. Because immunologic evaluations were performed every 2 years, the exact time of exposure could not be determined. Indeed, because the knowledge of the role of immune response in the pathogenesis of CL has grown rapidly, some mediators that may play important roles in the development of the disease, such as metalloproteinases, type 1 IFN- γ , and interleukin 1 β , were not evaluated. Nonetheless, we have made highly relevant observations. Specifically, we have demonstrated that IFN- γ production by NK cells and the ability of monocytes to control *Leishmania* were the defense mechanisms preventing subjects exposed to *L. braziliensis* from developing CL.

Notes

Acknowledgments. We thank all household contacts who participated in this study, the undergraduate students for the help with the enzyme-linked immunosorbent assays, and the secretaries of the Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos for their assistance in preparing this manuscript.

Financial support. This work was supported by National Institutes of Health (grant AI030639).

Potential conflicts of interest. All authors: No potential conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Alvar J, Velez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* **2012**; 7:e35671.
- Llanos Cuentas EA, Cuba CC, Barreto AC, Marsden PD. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1984**; 78:845–6.
- Follador I, Araujo C, Bacellar O, et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis* **2002**; 34:E54–8.
- Gomes-Silva A, de Cassia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, et al. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* **2007**; 149:440–4.
- Davies CR, Llanos-Cuentas EA, Pyke SD, Dye C. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. *Epidemiol Infect* **1995**; 114:297–318.
- Schnorr D, Muniz AC, Passos S, et al. IFN-gamma production to *Leishmania* antigen supplements the *Leishmania* skin test in identifying exposure to *L. braziliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis* **2012**; 6:e1947.
- Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Goncalves R, et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2007**; 102:625–30.
- Follador I, Araujo C, Cardoso MA, et al. Outbreak of American cutaneous leishmaniasis in Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brazil [in Portuguese]. *Rev Soc Bras Med Trop* **1999**; 32:497–503.
- Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* **2004**; 72:988–95.
- Louzir H, Melby PC, Ben Salah A, et al. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J Infect Dis* **1998**; 177:1687–95.
- Melby PC. Vaccination against cutaneous leishmaniasis: current status. *Am J Clin Dermatol* **2002**; 3:557–70.
- Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev* **2011**; 240:286–96.
- Franca-Costa J, Van Weyenbergh J, Boaventura VS, et al. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* **2015**; 211:426–35.
- Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* **2005**; 101:226–30.
- Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog* **2013**; 9:e1003504.
- Oliveira WN, Ribeiro LE, Schrieffer A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine* **2014**; 66:127–32.
- Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* **2005**; 73:7853–9.
- Cardoso TM, Machado A, Costa DL, et al. Protective and pathological functions of CD8⁺ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. *Infect Immun* **2015**; 83:898–906.
- Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol* **2011**; 49:3892–04.
- Reed SG, Badaro R, Masur H, et al. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **1986**; 35:79–85.
- Ben Salah A, Louzir H, Chlif S, et al. The predictive validity of naturally acquired delayed-type hypersensitivity to leishmanin in resistance to *Leishmania major*-associated cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* **2005**; 192:1981–7.
- Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* **2011**; 9:604–15.
- Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *J Infect Dis* **2014**; 209:1288–96.
- Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA, et al. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* **2001**; 69:3232–9.
- Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, et al. IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* infection. *Parasite Immunol* **2011**; 33:132–6.
- Akuffo HA, Maasho K, Howe R. Natural and acquired resistance to *Leishmania*: cellular activation by *Leishmania aethiops* of mononuclear cells from unexposed individuals is through the stimulation of natural killer (NK) cells. *Clin Exp Immunol* **1993**; 94:516–21.
- Nateghi Rostami M, Keshavarz H, Edalat R, et al. CD8⁺ T cells as a source of IFN- γ production in human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* **2010**; 4:e845.
- Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, et al. CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* **2002**; 168:3992–4000.

29. Colmenares M, Kima PE, Samoff E, Soong L, McMahon-Pratt D. Perforin and gamma interferon are critical CD8⁺ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun* **2003**; 71:3172–82.
30. Santos Cda S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, et al. CD8⁺ granzyme B⁺-mediated tissue injury vs. CD4⁺IFN γ ⁺-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* **2013**; 133:1533–40.
31. Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis* **2012**; 12:75.
32. Bosque F, Saravia NG, Valderrama L, Milon G. Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. *Scand J Immunol* **2000**; 51:533–41.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, EPIDEMIOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS DE CONTATOS FAMILIARES DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA DE ACORDO COM A EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO.

De 308 CF, 45 desenvolveram LC, 101 apresentaram infecção subclínica por *L. braziliensis* e 162 não apresentavam nenhum dos 2 testes positivos indicando não terem sido expostos à infecção por *L. braziliensis*. A TABELA 2 resume as características demográficas, epidemiológicas e imunológicas dos três grupos.

TABELA 1. Achados demográficos, epidemiológicos e imunológicos em contatos familiares (n=308) de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) de acordo com o desenvolvimento de LC ou infecção subclínica (SC) por *L. braziliensis*.^a

Variáveis	LC (N=45)	SC (N=101)	Controles negativos (N=162)	Valor de p
Idade	19 ± 9	25 ± 15 ^{b,c}	20 ± 12	0,017
Sexo masculino, n(%)	25(56%)	52(52%)	75(47%)	0,505
Ocupação				0,039
- Agricultor	13%	24%	21%	
- Domestico(a)	16%	32%	22%	
- Estudante e outros	71 %	45%	58%	
Anos na área endêmica (DP)	20 ± 9	25 ± 14 ^d	20 ± 11	0,018
Dados das quimiocinas (IQ)				
CXCL9 (meio)	4976[3000;14941]*	5307 [2413; 10019]*	4228 [1864; 7068]*	0,036
CXCL9 (SLA)	8912 [3252; 26158]*	11320 [5116; 40258]*	5257 [2772; 8216]* ^{e,f}	<0,001
CXCL10 (meio)	407 [0; 1764]*	591 [334; 1067]*	634 [374; 1279]*	0,285
CXCL10 (SLA)	713 [260; 28434]*	1203 [574; 6189]*	784 [441; 1622]* ^{g,h}	0,014

Abreviaturas: LC, leishmaniose cutânea; IQ, intervalo interquartil; SC, leishmaniose subclínica; DP, desvio padrão; SLA, antígeno solúvel de *Leishmania*.

^a O teste ANOVA foi utilizado para comparar as variáveis contínuas, o teste exato de Fisher para comparar as proporções e o teste de Kruskal-Wallis para comparar os valores de quimiocinas.

^b P = 0,04 para LC vs infecção SC; ^c P = 0,004 para infecção SC vs controle; ^d P = 0,005 para infecção SC vs controle; ^e P <0,001 para infecção SC vs controle; ^f P = 0,03 para LC vs controle; ^g P = 0,002 para a infecção SC vs controle; ^h P = 0,004 para LC vs controle.

Indivíduos que desenvolveram LC eram mais jovens do que os demais grupos e eram predominantemente estudantes. A produção de CXCL9 e CXCL10 em culturas estimuladas com *L. braziliensis* foi maior (P <0,005) nos indivíduos que tinham evidência de exposição à *L. braziliensis* independentemente do desfecho da infecção.

VIII.2 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS DE CONTATOS FAMILIARES COM EVIDÊNCIA DE INFECÇÃO POR *L. braziliensis*.

Dos 308 CF avaliados, a evidência de resposta imune determinada pela positividade da RM ao antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) ou pela produção de IFN- γ em culturas estimuladas por SLA, foi observada em 101 indivíduos como consta na TABELA 1 mostrada anteriormente. Os dados demográficos e epidemiológicos dos 101 CF com evidência de resposta imune ao SLA, que não adoeceram, estão apresentados na TABELA 2. Dos 45 indivíduos com RM positiva 25 (55,5%) também apresentavam produção de IFN- γ .

TABELA 2. Dados demográficos e epidemiológicos em 101 contatos familiares com evidência de resposta imune ao antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA).

Variáveis	RM+ (n=45)	IFN (+) RM(-) (n=56)	Valor de P
Idade	31.9 ± 16.2	21.1 ± 11.9	<0.001
Sexo, masculino n(%)	28 (62.2%)	25 (44.6%)	0.119
Hora de chegada em casa;			0.445
- Antes de 16h;	37 (82.2%)	48(85.7%)	
- 16h-18:59;	4 (8,9%)	6 (10.7%)	
- 17h-22:59;	2 (4.4%)	2 (3.6%)	
- 23h ou mais;	2 (4.4%)	0	
Ocupação			0.015
- Agricultor	8 (17.8%)	16 (28.6%)	
- Doméstico (a)	21 (46.7%)	11 (19.6%)	
- Estudante ou outros	16 (35.6%)	29 (51.8%)	
Anos de residência na área endêmica	31.2 ± 16.4	19.4 ± 9.5	<0.001
Anos na mesma casa	19.7 ± 14.9	13.75 ± 7.7	0.019
Dados das quimiocinas (IQ)			
CXCL9 (meio)	7694 [5926; 14118]	11081[7204;11979]	>0.05
CXCL9 (SLA)	40923[24062; 53354]	12990[12914; 18217]	
CXCL10 (meio)	829,7[634,6;1025]	1933 [1608; 2258]	
CXCL10 (SLA)	10724 [10135;11313]	2213 [1513; 2913]	

Abreviaturas: RM, Reação de Montenegro; SLA, antígeno solúvel de *Leishmania*.

O teste Mann Whitney foi utilizado para comparar as variáveis contínuas, o teste exato de Fisher para comparar as proporções e o teste de Kruskal-Wallis para comparar os valores das quimiocinas.

Os indivíduos com RM positiva eram mais velhos, tinham mais anos residindo na área endêmica, mais tempo morando na mesma casa e exerciam, em sua maioria, atividades no lar. Não houve diferenças entre os dois grupos com relação ao sexo, hora de chegada em casa e

entre a produção das quimiocinas apesar da produção estimulada de CXCL9 e CXCL10 ter sido maior no grupo que apresentou RM positiva.

VIII.3 CORRELAÇÃO ENTRE A REAÇÃO DE MONTENEGRO E PRODUÇÃO DE IFN- γ

A produção de IFN- γ e a resposta à RM são considerados marcadores da resposta imune celular. Como no presente estudo houve uma dissociação entre estes dois testes nós avaliamos a existência de concordância entre a produção de IFN- γ e o maior diâmetro da RM nos 101 indivíduos com evidência de resposta imune (FIGURA 2).

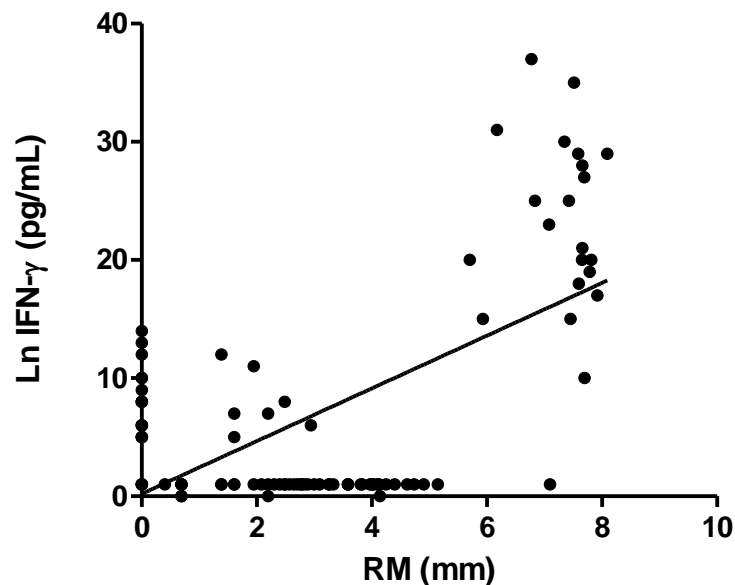


FIGURA 2: Correlação entre a Reação de Montenegro e a produção de IFN- γ (transformação logarítmica) em indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis*. Correlação realizada em 101 contatos familiares que apresentaram evidência de resposta imune ao antígeno de *Leishmania*. Foi realizada a correlação de Spearman utilizando-se o programa GraphPad Instat 3 ($p < 0,05$; $r = 0,31$).

Foi observado que 55,5% dos contatos familiares foram positivos para ambos os testes e 50,3% apresentaram resultados negativos para ambos os testes. Encontramos uma correlação positiva, porém esta correlação foi fraca, com $r = 0,31$ e $p < 0,05$. O teste de concordância Kappa: 0,23 (95% IC: 0.12-0.35), mostrou uma concordância razoável.

VIII.4 CORRELAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO DE IFN- γ E QUIMIOCINAS

CXCL9 e CXCL10 são quimiocinas pró-inflamatórias e ambas relacionadas com a produção de IFN- γ . A correlação entre a produção de IFN- γ e estas quimiocinas pelo teste de Spearman estão apresentadas nas FIGURAS 3A e 3B.

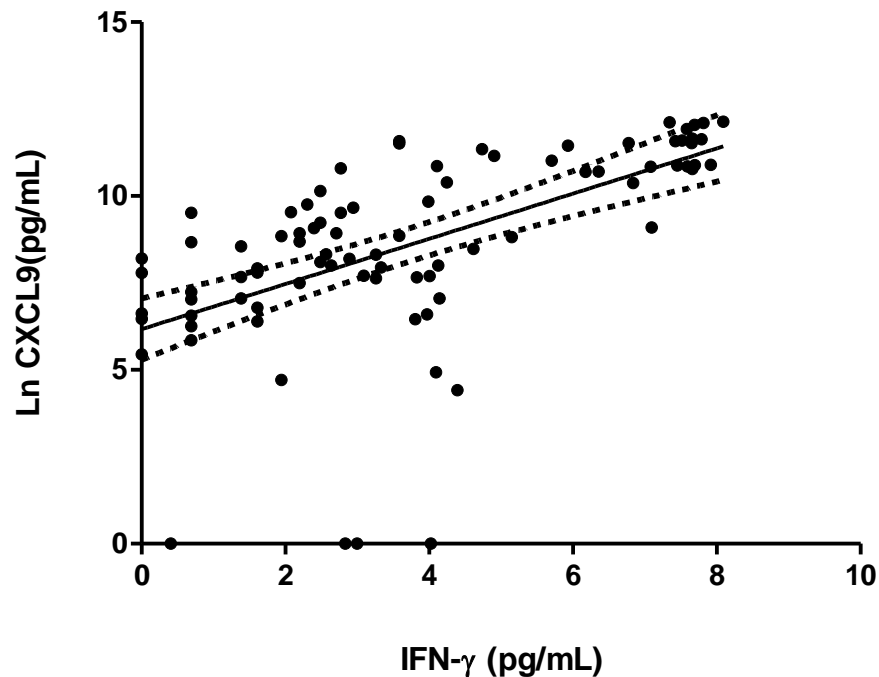


FIGURA 3A: Correlação entre a produção de IFN- γ e CXCL9 (transformação logarítmica para ambos) em indivíduos com infecção subclínica para *L. braziliensis*. Correlação entre a produção de IFN- γ (pg/ml) e a produção de CXCL9 (pg/ml) em 86 contatos familiares que apresentaram somente produção de IFN- γ durante os cinco anos de coorte. Foi utilizada a correlação de Spearman utilizando-se o programa GraphPad InStat 3 ($p < 0,0001$; $r = 0,67$).

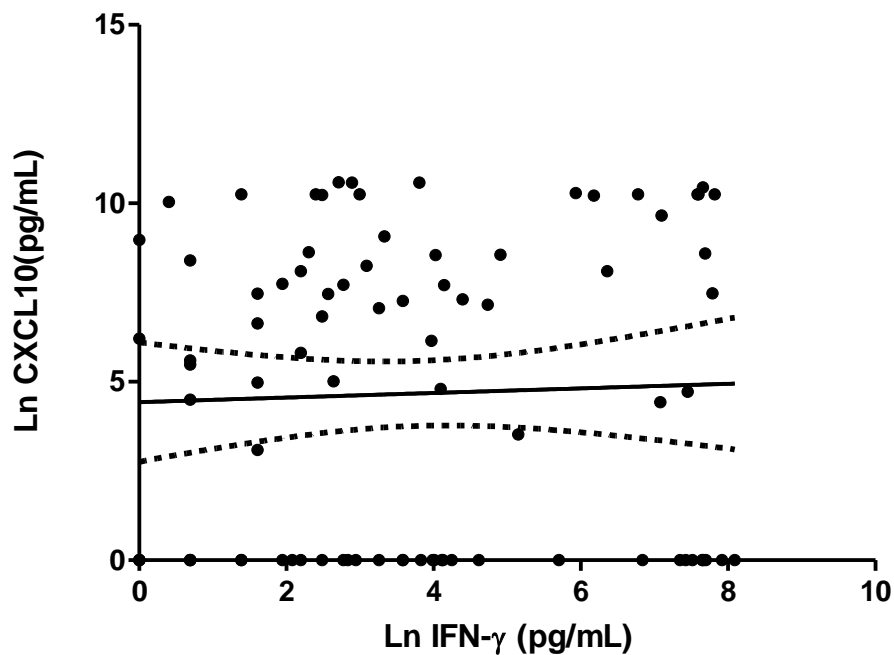


FIGURA 3B: Correlação entre a produção de IFN- γ e CXCL10 (Transformação logarítmica para ambos) em indivíduos com infecção subclínica para *L. braziliensis*. Correlação entre a produção de IFN- γ (pg/ml) e a produção de CXCL10 (pg/ml) em 86 contatos familiares que apresentaram somente produção de IFN- γ durante os cinco anos de coorte. Foi utilizada a correlação de Spearman utilizando-se o programa GraphPad InStat 3 ($p < 0,0001$; $r = 0,55$).

Para construção dessas figuras foram utilizados os maiores valores de quimiocinas e do IFN- γ obtidos nas diferentes avaliações. Este valor representa a subtração do resultado obtido entre as culturas estimuladas com antígeno de *Leishmania* e as culturas não estimuladas. Houve uma correlação positiva entre a produção de IFN- γ e as quimiocinas sendo que esta relação foi mais acentuada para a CXCL9 ($r = 0,6723$) do que para a CXCL10 ($r = 0,55$).

VIII.5 CORRELAÇÃO ENTRE A REAÇÃO DE MONTENEGRO E QUIMIOCINAS

Com a finalidade de avaliar a existência de correlação entre a Reação de Montenegro e a produção de quimiocinas, o maior diâmetro do teste cutâneo e o maior valor das quimiocinas entre as diferentes dosagens no mesmo indivíduo foram utilizados (FIGURA 4A E 4B).

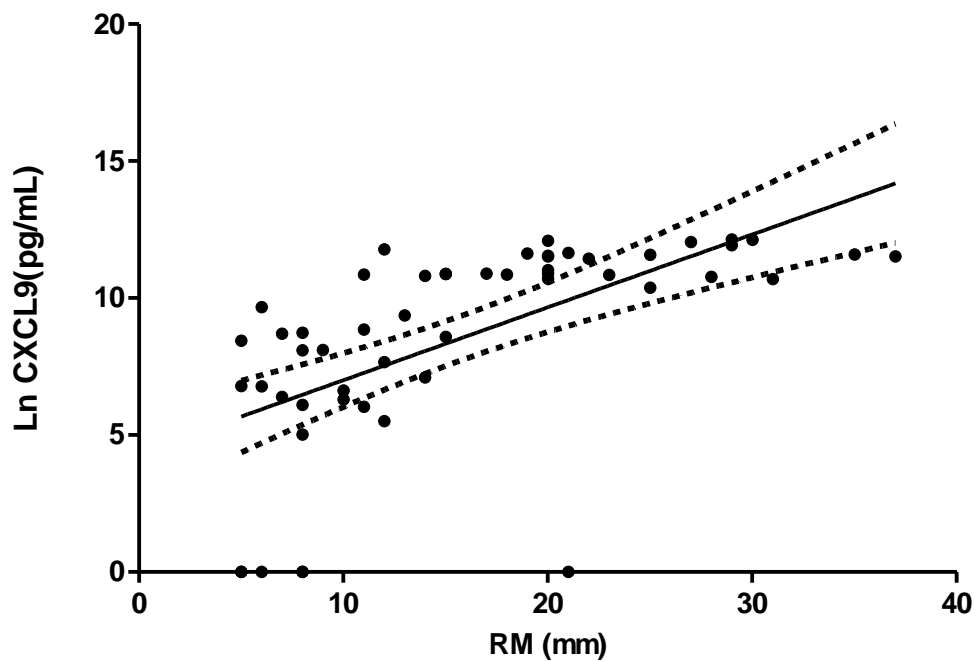


FIGURA 4A: Correlação entre a Reação de Montenegro e produção de CXCL9 (Transformação logarítmica) em indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis*. A correlação foi realizada com 53 contatos familiares. Foi utilizada a correlação de Spearman, através do programa GraphPad Instat 3 ($p < 0,0001$; $r = 0,74$).

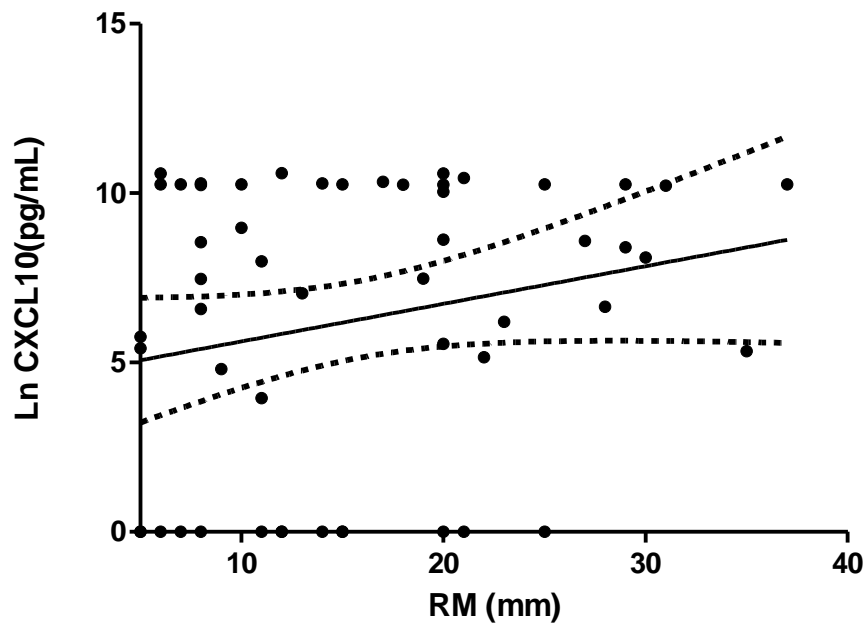


FIGURA 4B: Correlação entre a Reação de Montenegro e produção de CXCL10 (Transformação logarítmica) em indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis*. A correlação foi realizada com 53 contatos familiares. Foi utilizada a correlação de Spearman, através do programa GraphPad InStat 3 ($p > 0,05$; $r = 0,24$).

Foi observada uma forte correlação entre o maior diâmetro da RM e CXCL9, ($r = 0,74$) mas não houve correlação entre a RM e a produção de CXCL10, ($r = 0,24$).

VIII. 6 DESFECHO CLÍNICO DE ACORDO COM A POSITIVIDADE DA REAÇÃO DE MONTENEGRO OU DA PRODUÇÃO DE IFN- γ

De 308 CF acompanhados por cinco anos, 118 (38,3%) tinham evidência de resposta imune, com 53 (17,2%) apresentando RM positiva, dos quais 30 (56,6%) produziram IFN- γ . Foi identificado que 65 (25,5%) dos 308 CF apresentaram evidência de produção de IFN- γ , apesar de a RM ter sido negativa. Ao utilizar ambos os testes como evidência de infecção por *L. braziliensis*, a probabilidade de detectar a exposição a *L. braziliensis* aumentou 2,2 vezes em relação ao uso da RM sozinha. A FIGURA 5 ilustra a dinâmica entre a evidência de

resposta imune baseada na RM positiva ou produção IFN- γ , o desenvolvimento de LC e o número de indivíduos que permaneceram sadios ao longo dos 5 anos.

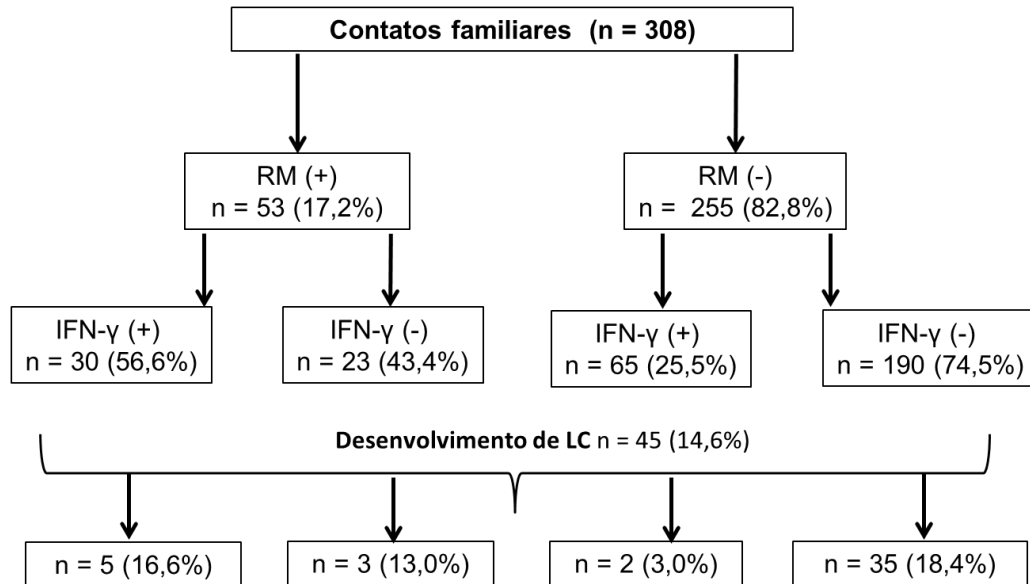


FIGURA 5. Desenvolvimento de leishmaniose cutânea ou infecção subclínica por *L. braziliensis* em contatos familiares de pacientes com leishmaniose cutânea. Os dados indicam o número de indivíduos que tinham evidência de resposta imune baseado na positividade da Reação de Montenegro e o produção IFN- γ durante os 5 anos de acompanhamento e o número de contatos familiares que desenvolveram LC. Os sinais em parênteses (+ e -) indicam os resultados positivos e negativos, respectivamente.

Durante os 5 anos de acompanhamento, 45 (14,6%) CF de pacientes com LC desenvolveram LC. Dos que desenvolveram LC, 19 contraíram a doença no primeiro ano, 10 no segundo ano, 9 no terceiro ano, 4 no quarto ano, e 3 no quinto ano. Entre aqueles que desenvolveram LC (n=45), 8 (17,8%) tinham uma RM positivo antes de desenvolver sinais da doença. Enquanto LC foi observada em 16,6% dos indivíduos com teste cutâneo positivo que apresentaram produção de IFN- γ , somente 2 (3,0%) dos 65 CF que produziram IFN- γ e que possuíam o RM negativo desenvolveram LC. Os 35 (18,4%) CF restantes que desenvolveram LC tinham a RM negativa e não produziram IFN- γ .

VIII.7 RAZÃO DE INCIDÊNCIA E RISCO RELATIVO PARA DESENVOLVIMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA DE ACORDO COM A RESPOSTA IMUNE AO ANTÍGENO DE *LEISHMANIA*

A razão de incidência foi calculada de acordo com a resposta imune ao SLA: produção de IFN- γ , RM positivo, e ambos os testes RM e IFN- γ negativos (TABELA 3).

TABELA 3. Razão de incidência e risco relativo de leishmaniose cutânea de acordo com a resposta imune em uma coorte de contatos familiares de pacientes com leishmaniose cutânea.

Grupos	Incidência (casos de LC)	Observação Pessoa-ano	Razão de incidência por 100 pessoas-ano (95% IC)	Risco Relativo (95% IC)*
RM (+)	8	138	5.79 (2.50-11.42)	0.96 (0.38 para 2.10)
RM (-) IFN γ (+)	2	214	0.93 (0.11-3.37)	0.15 (0.02 para 0.58)
RM (-) IFN- γ (-)	35	578	6.05 (4.21-8.42)	-

Legenda: LC = Leishmaniose Cutânea; RM = Reação de Montenegro; *O risco relativo foi calculado usando RM (-) IFN- γ (-) como grupo de referência (denominador).

O cálculo de pessoa-ano foi usado porque as pessoas estavam continuamente sob vigilância para a doença, mas apenas avaliados periodicamente para a infecção (Weigle et al. 1993). Essa análise mostrou que enquanto o risco de desenvolver LC foi similar nos grupos RM (+) e RM (-) IFN- γ (-), o risco foi reduzido em 85% naqueles que apenas apresentaram produção de IFN- γ quando comparados ao grupo sem evidência de resposta imune. Ao comparar a frequência de LC em CF que eram IFN- γ positivo, CF que eram RM (+) tem 6,2 mais chances de desenvolver LC do que aqueles que apenas apresentaram produção de IFN- γ .

VIII.8 ANÁLISE DAS CÉLULAS PRODUTORAS DE IFN- γ

Como a produção de IFN- γ parece ser um fator importante de proteção contra a doença, foi realizada a avaliação da fonte celular produtora desta citocina, através da citometria de fluxo utilizando células de indivíduos SC que pertenciam ao grupo IFN- γ (+) e RM (-) e nos indivíduos que desenvolveram LC (FIGURA 6A, 6B e 6C).

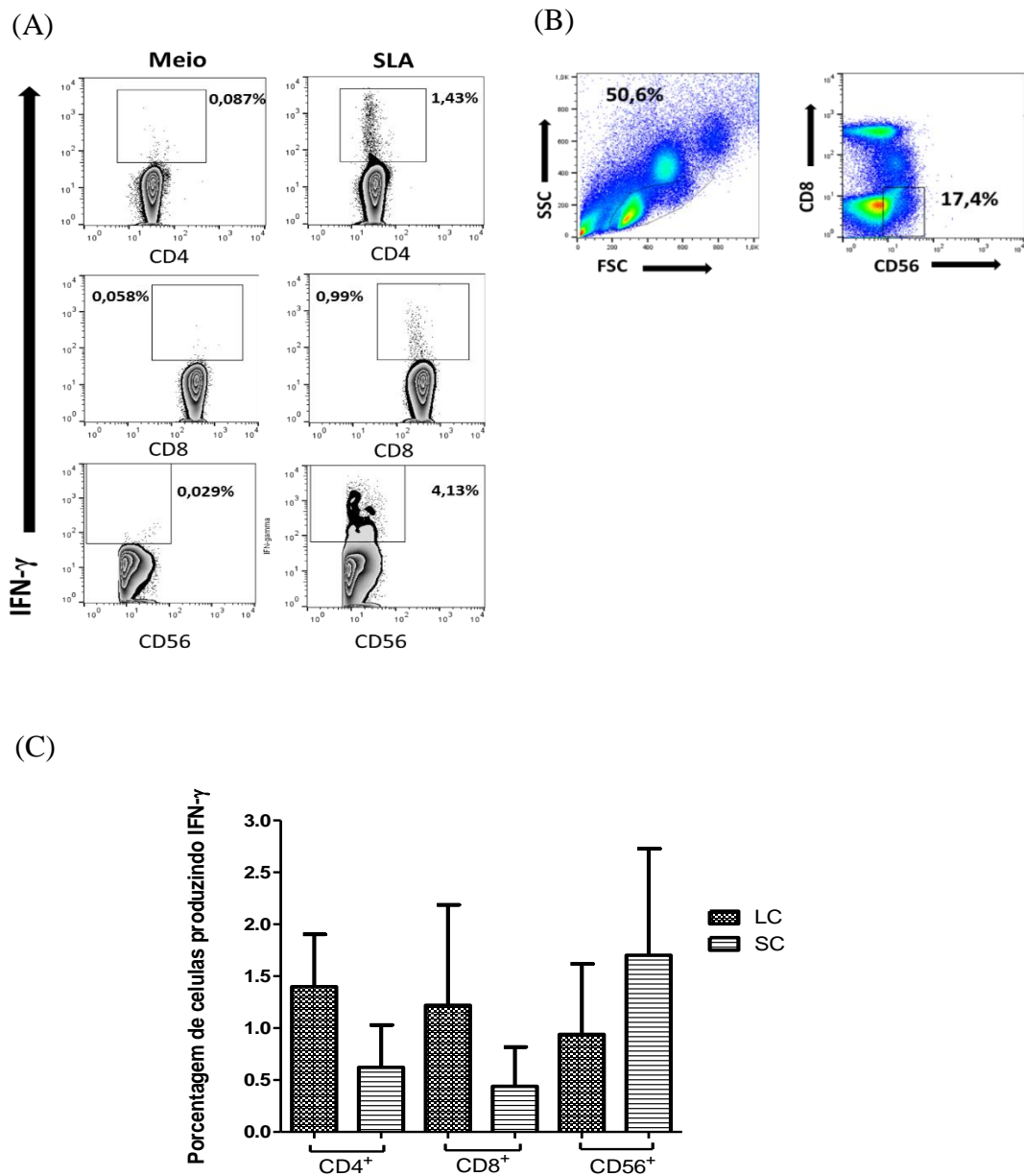


FIGURA 6 Análise de células produtoras de IFN- γ . (A) Plots representativos da estratégia de seleção para células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD56⁺ em culturas sem estímulo e estimuladas

com SLA. As regiões foram delimitadas de acordo com a marcação de superfície para CD4, CD8, CD3 e CD56. (B) Plot representativo das populações de linfócitos e células NK CD56⁺CD8⁻ em um indivíduo com leishmaniose cutânea (C) Média da frequência total de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD56⁺ de contatos familiares (N=5) e pacientes com LC (N=10) expressando IFN- γ após estímulo com SLA. As células mononucleares de sangue periférico de CF e pacientes com LC foram estimulados com 5 μ g de SLA. Dados foram coletados usando citometria de fluxo e analisados usando o software FLOWJO. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

A maior fonte de produção de IFN- γ em SC (RM-IFN- γ ⁺) foram as células NK (CD56⁺) com 1.7%, seguidos por células T CD4⁺, 0.62% e células T CD8⁺, 0.43%. Nos pacientes com LC a principal fonte produtora de IFN- γ foram as células T CD4⁺ com 1.4%, seguidas pelas células T CD8⁺ (1.2%) e pelas células NK (0.94 %). Apesar das diferentes proporções observadas entre as populações celulares não foi encontrada significância estatística.

VIII.9 CAPACIDADE DE MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO SUBCLÍNICA EM CONTROLAR A INFECÇÃO POR *L. braziliensis*.

Para avaliar a capacidade de monócitos em controlar a infecção, células de indivíduos SC e de pacientes com LC foram infectados com *L. braziliensis* e o número de células infectadas e o número de parasitos intracelulares foram avaliados através de microscopia óptica (FIGURA 7).

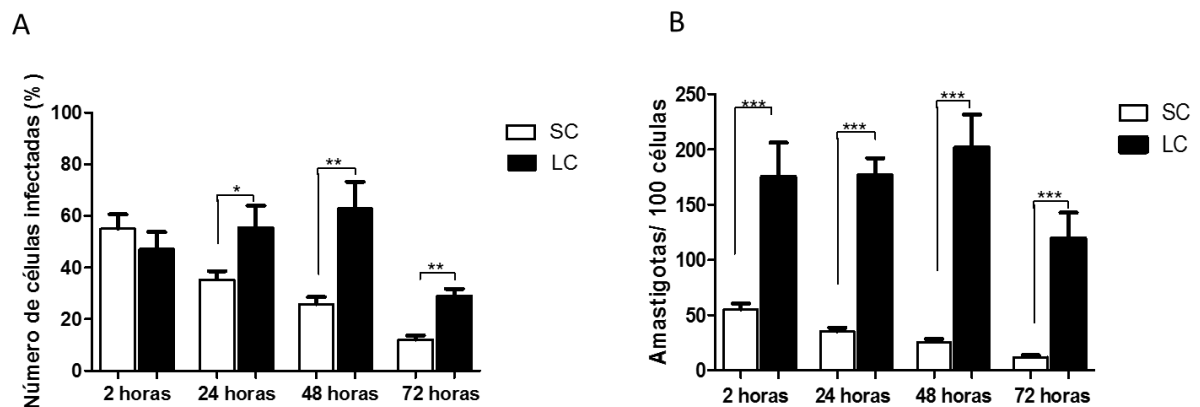


FIGURA 7A E 7B. Fagocitose e a capacidade de monócitos de indivíduos subclínicos (SC) em controlar infecção por *L. braziliensis*. Monócitos de 7 indivíduos com infecção SC e 7 pacientes com LC foram infectados com *L. braziliensis* em uma relação de 5:1 em diferentes tempos. O número de células infectadas (A) e o número de parasitas intracelulares (B) foram determinados por avaliação microscópica após coloração May-Grunwald-Giemsa a partir de preparações em citocentrífuga. Os dados estão resumidos em médias e desvios-padrão. * P <0,05; ** P <0,01 (teste de Mann-Whitney).

A porcentagem de células infectadas foi similar após 2 horas de infecção em ambos os grupos (55±15% em SC e 47±17% em LC), $p>0.05$. Entretanto, houve uma diminuição do número de células infectadas após 24, 48 e 72 horas em monócitos de indivíduos SC em relação aos monócitos de pacientes com LC (35,3 ± 8,6% versus 55,4 ± 22,5%; 25,7 ± 7,5% versus 62,9 ± 27,5% e 12 ± 4,3% versus 29 ± 7,2%, respectivamente) (* $p>0.05$; ** $p>0.01$), como mostrado em na FIGURA 7A.

O número de amastigotas por 100 células foi menor em monócitos de indivíduos SC em comparação aos pacientes com LC. Após 2h (55 ± 14,8 versus 175,3 ± 81,6), 24h (35,3 ± 8,6 versus 176,9 ± 40,4), 48h (25,7 ± 7,5% versus 202 ± 78,7) e 72h (12 ± 4,3 contra 119,7 ± 61), *** $p <0,001$, respectivamente.

Para avaliar se a diminuição na carga de parasita foi relacionada com a morte da *Leishmania*, avaliou-se a viabilidade de promastigotas na cultura de monócitos infectados de pacientes com LC e indivíduos SC. O número de promastigotas viáveis em meio Schneider's foi maior em monócitos infectados de pacientes com LC ($23 \pm 6,4$) do que em indivíduos SC ($9,6 \pm 16$), $P < 0,01$ (Dados não mostrados).

VIII.10 REVERSIBILIDADE DA REAÇÃO DE MONTENEGRO E DA PRODUÇÃO DE IFN- γ

Estudos prévios têm mostrado que a resposta imune celular em pacientes curados de LC é duradoura, indicando uma memória imunológica (Da-Cruz et al., 2002). Com referência aos indivíduos sem história de LC e residentes em área de transmissão de *Leishmania* tanto a Reação de Montenegro quanto a produção *in vitro* de IFN- γ são marcadores de exposição à *Leishmania* e de infecção subclínica (Schnorr et al., 2012). Todavia, não é conhecido por quanto tempo estes testes permanecem positivos. A TABELA 4 mostra a frequência de CF que negativaram a RM e a produção de IFN- γ durante o estudo.

TABELA 4. Reversibilidade da Reação de Montenegro e da produção de IFN- γ em 89 indivíduos com infecção subclínica que apresentaram testes positivos durante a coorte.

Teste imunológico	Total de positivos	Nº de indivíduos que negativaram o teste		
		(Em 2012)	(Em 2014)	TOTAL
RM	33	8 (24,2%)	3 (9%)	11 (33,3%)
IFN- γ	56	9 (16%)	3 (5,3%)	12 (21,4%)

A coleta bianual dos dados nos possibilitou constatar que tanto a resposta imune celular quanto a produção de IFN- γ são reversíveis e que esta resposta, em alguns indivíduos

não é duradoura. Excluindo da análise os indivíduos que adoeceram e as perdas de seguimento (n = 13) devido à mudança de endereço, falecimento ou recusa de continuar a participar do estudo, 89 indivíduos apresentaram positividade à RM ou produção de IFN- γ . Dos 33 indivíduos que apresentaram a RM positiva, 11 negativaram sendo que 8 (24,2%) negativaram a partir da 2ª avaliação e 3 (9%) na 3ª avaliação. No total, 21,4% dos CF que apresentavam produção de IFN- γ deixaram de produzir esta citocina ao longo do estudo.

Analisamos então, se os valores tanto do diâmetro da RM quanto da produção de IFN- γ (pg/mL) poderiam ser indicativos de uma futura negativação dos testes (FIGURA 8A e 8B).

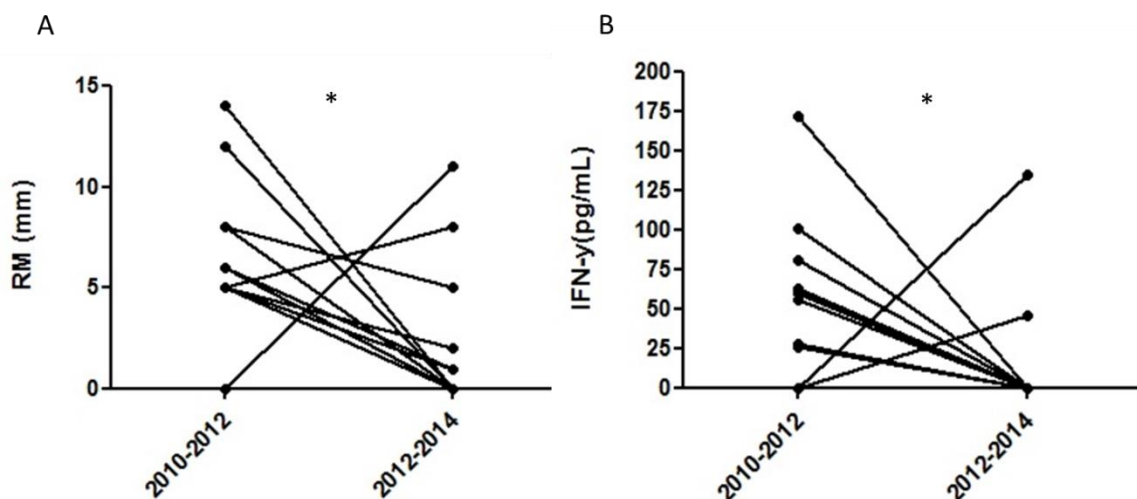


FIGURA 8A e 8B. Reação de Montenegro (n = 11) e produção de IFN- γ (n = 13) em resposta ao antígeno de *Leishmania* em CF que negativaram ou positivaram os testes imunológicos durante a coorte. Análise feita através do teste de Mann Whitney utilizando-se o programa GraphPad Instat 3.

Nos indivíduos que tiveram os testes negativados tanto o diâmetro da RM e quanto a produção de IFN- γ foram maiores no 1º biênio. Entre 2010-2012 a média do diâmetro da RM nos indivíduos que negativaram foi de $6,7 \pm 3,7$ mm e entre 2012-2014 a média foi de $2,5 \pm 3,8$ mm ($p = 0,02$). Para o IFN- γ as médias foram de 54 ± 49 pg/ml entre 2010-2012 e 15 ± 40 pg/ml entre 2012-2014 ($p = 0,016$).

IX. DISCUSSÃO

O entendimento da infecção por *L. braziliensis* em indivíduos naturalmente expostos que não desenvolvem a doença é importante para determinar os mecanismos de controle da infecção e susceptibilidade ao desenvolvimento da leishmaniose tegumentar e, pode contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos e vacinas. Neste estudo foi sugerido que o controle da infecção se relaciona predominantemente com a resposta imune inata. Nós também documentamos que os monócitos desempenham um papel importante no controle da infecção por *L. braziliensis*, pois foram menos permissivos à infecção por *Leishmania* e controlaram o crescimento do parasito de forma mais eficaz do que as células dos pacientes com LC. Apesar de não documentarmos uma associação entre reação de Montenegro e proteção contra o desenvolvimento da doença, a produção de IFN- γ foi associada com a capacidade de controlar a infecção por *L. braziliensis*. Os resultados sugerem que em indivíduos SC as células NK são a principal fonte de IFN- γ .

A LC acomete predominantemente adultos jovens do sexo masculino. Indivíduos com infecção subclínica tiveram idade superior aos pacientes com LC, mas a infecção SC foi documentada de modo similar em ambos os sexos. Este dado confirma a observação previa em uma área de transmissão de *L. braziliensis* diferente da estudada no presente trabalho (Follador et al., 2002). Enquanto pacientes com LC tinham predominantemente atividade na agricultura, os indivíduos com infecção subclínica exerciam atividade no ambiente domiciliar e tinham maior tempo de residência na área endêmica que pacientes com LC e os controles sem evidência de infecção. A documentação da maior produção de quimiocinas em culturas estimuladas com SLA em indivíduos com infecção subclínica do que em controles sem evidência de infecção é indicativo da exposição prévia à infecção por *L. braziliensis*.

A infecção subclínica por *L. braziliensis* tem sido identificada pela presença de um teste cutâneo de hipersensibilidade tardio positivo ao antígeno de *Leishmania* (Bosque et al., 2000; Follador et al., 2002). Previamente nós tínhamos documentado que em adição ao teste cutâneo, a produção de IFN- γ em culturas de sangue total, estimulado com antígeno de *Leishmania* também era uma evidência de exposição à *L. braziliensis* (Schnorr et al., 2012). Comparando os aspectos demográficos e epidemiológicos em indivíduos SC que apresentavam reação de Montenegro positiva com o grupo que apresentava apenas produção de IFN- γ foi observado que os indivíduos com evidência de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* tinham idade superior e residiam há mais tempo na área endêmica do que os indivíduos somente produtores de IFN- γ . Na infecção causada pela *L. infantum* é bem documentada a correlação entre idade e positividade do teste cutâneo (Badaró et al., 1986; Lima et al., 2012). Boroujeni et al., (2013) também mostraram que a média da idade dos casos RM-positivos foi maior do que os casos com RM negativos em uma área endêmica para *L. major*. Desta forma, é possível que exposições repetidas ao parasito induzam o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa sendo, portanto, esperado que a idade e o tempo de residência na área endêmica se relacionem com a positividade da RM em indivíduos SC.

Os testes de hipersensibilidade tardia e a avaliação da resposta imune *in vitro* determinada pela proliferação de linfócitos e produção de citocinas frente a antígenos têm sido amplamente utilizados para determinar evidência da ocorrência de resposta imune mediada por células (Sassi et al., 1999; Mascarenhas et al., 2006; Bittar, et al., 2007; Gomes-Silva, A. et al., 2007). No presente estudo nós documentamos uma correlação direta, embora fraca entre a produção de IFN- γ e o tamanho da induração do teste intradérmico. Carvalho et al., (1992) mostraram, em indivíduos infectados com *L. infantum*, uma discordância entre a resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- γ . Discordância entre a reação intradérmica e

a produção de IFN- γ têm sido observada em contatos domiciliares de pacientes com tuberculose latente (Oztürk et al., 2007; Machado A. et al., 2009 ; Delgado et al. 2011) assim como em indivíduos saudáveis não contactantes (Mahomed et al., 2006) e na tuberculose ativa (Detjen et al., 2009). Entretanto, em indivíduos infectados com *L. infantum* e em pacientes com tuberculose geralmente a restauração do teste de hipersensibilidade tardia ocorre após terapia específica ou com a melhora do estado nutricional (Cerf et al., 1987; Yoneda, 1989). Como os participantes desse estudo eram aparentemente saudáveis, não apresentavam sinais visíveis de desnutrição, e provavelmente foram expostos à *L. braziliensis*, a explicação mais provável para a fraca concordância observada entre a RM e a produção de IFN- γ nos indivíduos com teste de hipersensibilidade tardia negativo e IFN- γ positivo é a produção de IFN- γ por células não T.

Avaliamos também, no presente estudo, a existência de correlação entre as quimiocinas CXCL9 e CXCL10 e a produção de IFN- γ e o teste intradérmico ao antígeno de *Leishmania*. É bem conhecida a forte relação entre o IFN- γ e as quimiocinas acima mencionadas. CXCL9 foi inicialmente denominada de monocina induzida por IFN- γ (MIG) e a CXCL10, proteína indutora de IFN- γ ou IP-10. Desta forma, por estar relacionado à produção de IFN- γ , era esperada a existência de uma forte correlação entre a produção de IFN- γ e as concentrações destas citocinas. Entretanto, foi observada apenas uma correlação moderada, sugerindo que talvez, nos indivíduos que apenas apresentaram produção de IFN- γ , a produção dessas quimiocinas seja feita por células de diferentes linhagens. Um estudo realizado com macrófagos, infectados com *L. braziliensis*, mostrou que indivíduos com infecção subclínica produzem menos CXCL9 que macrófagos de pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, sugerindo que essas moléculas participam também da forte resposta inflamatória observada na LTA (Giudice et al., 2012). Em relação ao teste cutâneo, enquanto foi observada uma forte correlação entre o tamanho da induração e a produção de

CXCL9, não houve correlação entre a RM e a concentração de CXCL10. Adicionalmente, a análise da produção de quimiocinas, principalmente no que se refere à CXCL10 sugere que esta quimiocina pode estar sendo produzida por células que não estejam participando da resposta ao teste de hipersensibilidade tardia.

Em um estudo realizado com pacientes infectados com *L. major* foram avaliados pacientes curados, indivíduos subclínicos e controles não infectados de acordo com a resposta ao teste intradérmico, presença ou ausência de cicatrizes e citocinas produzidas após estímulo com SLA. Foi observado que a produção de IFN- γ possui uma especificidade de 96%, sensibilidade de 86%, valor preditivo positivo de 0,97% e valor preditivo negativo de 0,66% quando utilizado para detectar os indivíduos com RM positivo (Kammoun-Rebai et al., 2016). Desta forma, a observação de que a produção de IFN- γ complementa a RM na detecção da exposição à infecção pode abrir discussões para o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico. Esta observação é relevante uma vez que os testes usados para detecção de infecção por *M. tuberculosis* através da dosagem de IFN- γ tem sido utilizados como substitutos ao teste tuberculínico (Salinas et al., 2011). No caso da tuberculose, a produção de IFN- γ tem sido detectada pelo teste denominado QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT-G) que é um teste no qual é utilizado sangue total do paciente para detecção *in vitro* de produção de IFN- γ . No nosso caso, a produção de IFN- γ foi feita em sobrenadante de sangue total, estimulado com antígeno de *Leishmania*. Nos estudos com pacientes com tuberculose e com contactantes tem sido mostrado uma maior sensibilidade do teste cutâneo em relação ao QFT-G (Salinas et al., 2011), enquanto no nosso estudo a produção de IFN- γ teve um poder de detecção maior que o teste cutâneo. Várias possibilidades existem para explicar esta diferença. Enquanto o QFT-G utiliza antígenos recombinantes do *M. tuberculosis*, nós utilizamos antígeno bruto solúvel de *L. braziliensis*, sendo, desta forma, menos específico. Adicionalmente, a produção desta citocina pode ser feita, na infecção subclínica, por outras

células em adição a célula T. Em relação à leishmaniose, o QuantiFERON® modificado, utilizando antígenos de *L. major* e *L. infantum* no sangue total de indivíduos com história de LC curada ou leishmaniose visceral, respectivamente, foi utilizado para monitorar a exposição prévia à infecção por *Leishmania*. Indivíduos com história prévia de LV produziram uma grande quantidade de IFN- γ , enquanto indivíduos que tiveram LC causadas por *L. tropica* no passado produziram menos IFN- γ em resposta a estes antígenos (Turgay et al., 2010). Desta forma, a utilização do IFN- γ como um teste auxiliar para detecção de infecção por *Leishmania*, seria vantajoso pois otimizaria o tempo de avaliação, desde que não haveria necessidade de uma segunda visita, 72h após a primeira, para leitura do teste intradérmico. Isso também é de grande importância para estudos realizados em zonas rurais onde existe dificuldade de transporte. Além disso, o resultado não sofreria influência do viés do leitor e os resultados não seriam afetados pelo reforço da resposta imune, caso seja feita uma segunda aplicação, levando a resultados falso-positivos. Todavia, os dados obtidos no presente estudo indicam que um desses testes suplementa o outro aumentando o poder de detecção de indivíduos com infecção SC.

É bem conhecido, nas doenças infecciosas, que o número de indivíduos infectados é bem superior ao número de pacientes. Em uma área de transmissão de *L. braziliensis* diferente da que estudamos, foi encontrada uma razão da infecção para a doença de 3,7:1 (Follador et al., 2002). No nosso trabalho a razão de infecção para a doença foi de 3,2:1. Esse dado também é compatível com o achado na infecção por *L. Major*, onde a proporção de infecção assintomática para doença foi de 3:1 (Salah et al., 2005).

O principal objetivo do presente estudo foi a identificação de marcadores imunológicos associados com a proteção contra a doença causada por *L. braziliensis*. Em uma área endêmica de *L. major* foi documentado que a presença de um teste cutâneo positivo reduzia significativamente a progressão da infecção para a doença. Todavia, a frequência de

desenvolvimento de leishmaniose entre os indivíduos com teste cutâneo positivo foi observada em 37,5% e 11,4% a depender da localidade avaliada (Salah et al., 2005). Já foi mostrada uma relação entre a positividade da RM com o desenvolvimento de LC (Weigle et al., 1993; Boroujeni et al., 2013). Na nossa coorte, utilizando os dois testes, produção de IFN- γ e o teste intradérmico, detectamos mais de 1/3 de indivíduos expostos à infecção por *L. braziliensis*. Entretanto, quando avaliamos a relação entre a positividade destes testes e o desenvolvimento da LC foi observado que enquanto havia uma associação entre a produção de IFN- γ e proteção contra a doença, esta associação não foi observada com relação ao teste intradérmico. Na verdade, a razão de incidência da LC foi de 6,2 vezes maior nos indivíduos com teste intradérmico positivo do que nos produtores de IFN- γ , mostrando que a produção de IFN- γ reduziu o risco de desenvolvimento de LC em 85%. Adicionalmente, o maior número de pessoas que adoeceram estava no grupo cuja RM e produção de IFN- γ foram negativos. Isto reafirma a importância do papel de resposta imune inata bem modulada e da importância da produção de IFN- γ para que a infecção por *L. braziliensis* não se instale. Entretanto, ainda não foram feitas, por exemplo, as avaliações dos prontuários dos indivíduos subclínicos que adoeceram nesta coorte para ver se encontraremos algo que poderia explicar o maior número de indivíduos que desenvolveram LC ou que indique um padrão de resposta terapêutica nestes indivíduos que não apresentaram evidência de resposta imune.

A documentação de uma fraca associação entre o teste intradérmico de hipersensibilidade tardia e a produção de IFN- γ , e a observação de que enquanto a produção de IFN- γ se associava com a proteção contra o desenvolvimento de LC, e de que o mesmo não era observado com a reação de hipersensibilidade tardia, são fortes indicadores da diferença entre as respostas imunológicas associadas com a positividade destes testes. A principal hipótese no sentido de explicar a diferença entre esses dois testes foi que há diferença entre as células produtoras de IFN- γ em indivíduos com infecção subclínica que

eram protegidos do desenvolvimento da doença e os SC que desenvolveram LC. Evidências de que o IFN- γ pode ser produzido por outras células da resposta imune inata têm sido documentadas (Venuprasad et al., 2003). Uma das fontes de IFN- γ pode ser a célula NK (Scharton & Scott, 1993; Maasho et al., 1998). Em um estudo realizado com contactantes de pacientes com LC na Etiópia, foi observado que a principal fonte de IFN- γ nestes indivíduos eram as células NK (Maasho et al., 1998). Vários estudos têm mostrado que o IFN- γ participa na ativação de células fagocíticas induzindo a morte do parasita (Kaye & Scott, 2011; Novais et al., 2014), mas existem várias fontes celulares produtoras de IFN- γ (Bottrel et al., 2001; Cardoso et al., 2015). Verificamos que todas as três populações de células analisadas, células CD56⁺, células T CD4⁺ e células T CD8⁺ produzem IFN- γ , mas, as células NK CD3⁻CD56⁺ eram as principais fonte desta citocina em indivíduos expostos à *L. braziliensis* que não desenvolveram LC. Nos pacientes com LC a principal fonte de IFN- γ foram as células T CD4⁺. A produção de IFN- γ pode ter um papel duplo na infecção por *L. braziliensis*. Em pacientes com LC, existe uma correlação entre a frequência de células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ e o tamanho da lesão (Antonelli et al., 2005). Além disso, a produção de IFN- γ é maior em LC do que nos indivíduos subclínicos (Follador et al., 2002; Novoa et al., 2011). Sendo assim, é provável que no início da infecção, a produção de IFN- γ esteja relacionada com a proteção, enquanto que na fase tardia da infecção esteja associada com patologia (Rocha et al., 1999; Barthelmann et al., 2012). Na LC causada pela *L. braziliensis* todos os pacientes têm RM positivo e produzem IFN- γ *in vitro*. A documentação de que as células NK são a principal fonte de IFN- γ na infecção subclínica também pode explicar a fraca correlação entre a RM e a produção de IFN- γ nesses indivíduos. Neste contexto, a resposta à RM pode estar relacionado com as células T enquanto o IFN- γ é produzido pelas células NK. Já foi demonstrado que a entrada das células NK nos nódulos linfáticos é mediada por CXCR3 e

que nesses locais as células NK fornecem uma fonte inicial de IFN- γ que é necessário para a polarização Th1 (Martín-Fontecha et al., 2004).

A morte da *Leishmania* é mediada por macrófagos ativados por IFN- γ ou pela citotoxicidade induzida por células T CD8⁺ ou células NK (Akuffo et al., 1993; Colmenares et al., 2003; Rostami et al., 2010). Entretanto, na LC causada por *L. braziliensis*, as células T CD8⁺ citotóxicas estão mais envolvidas na patologia do que na morte do parasito (Santos et al., 2013; Cardoso et al., 2015). Portanto, estudos devem ser realizados para avaliar se, além de ser uma importante fonte de IFN- γ em SC, as células NK nesses indivíduos têm a capacidade de matar *L. braziliensis*.

Em estudos prévios, a produção de citocinas por macrófagos e a capacidade de matar leishmania foram comparados entre indivíduos com infecção subclínica e pacientes com LC. Macrófagos de SC infectados com *L. braziliensis* produziam menos TNF e CXCL9 e possuíam uma maior capacidade de matar o parasito do que pacientes com LC (Giudice et al., 2012). Além disso, macrófagos de indivíduos subclínicos são menos permissivos à penetração da *L. panamensis* do que as células de pacientes com LC (Bosque et al., 2000). Nosso estudo demonstrou que, houve uma diminuição significativa na porcentagem de monócitos infectados em todos os períodos de tempo, bem como, um baixo número de parasitos internalizados 2 horas após a infecção, indicando uma diminuição da capacidade da *L. braziliensis* em penetrar em monócitos de indivíduos SC. Já foi demonstrado que monócitos de pacientes com LC infectados com *L. braziliensis* expressam mais TLR2 e TLR4 quando comparado com monócitos de indivíduos saudáveis (Carneiro et al, 2016) e a ausência desses receptores diminuiu a carga parasitária em animais infectados com *L. amazonensis* (Guerra et al., 2010). Uma diminuição da expressão desses receptores em células de pacientes SC poderia explicar a diminuição na penetração de *L. braziliensis* nas células desses indivíduos. Estudos em andamento vão avaliar a expressão desses receptores nos monócitos de indivíduos SC.

Em modelos experimentais de infecção por leishmania, acredita-se que o óxido nítrico (NO) é a principal molécula envolvida na morte do parasito (Liew et al, 1990; Assreuy *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1993). O efeito de espécies reativas do oxigênio (ROS) na morte da leishmania tem sido mostrado como pouco relevante em estudos *in vitro* com diferentes espécies de leishmania (Assreuy et al., 1994; Blos et al., 2003; Sousa-Franco et al, 2006). Entretanto, tem sido observado que embora a produção de ROS não seja importante na morte do parasito, ele pode regular a resposta inflamatória (Roma, 2016), que é responsável pelo desenvolvimento da lesão tecidual observada em pacientes com LC.

Recentemente, um estudo realizado com células de pacientes com LC mostrou uma alta produção de burst oxidativo pelos monócitos infectados com *L.braziliensis* e essa produção estava mais relacionada com a produção de ROS do que a produção de NO (Carneiro et al, 2016). Interessantemente, a produção dessas moléculas era maior quando comparado com a produção pelos monócitos dos indivíduos SC (Carneiro, 2016). Enquanto a inibição da via do ROS permitiu uma maior sobrevivência da leishmania no grupo dos pacientes com LC, indicando que essa molécula pode controlar o crescimento do parasito, no grupo dos indivíduos SC, a inibição das 2 vias (do NO e do ROS) não afetou a sobrevivência do parasito, sugerindo que outras vias, ainda não identificadas, podem estar envolvidas no controle da infecção nesses indivíduos (Carneiro, 2016). Dessa forma, os mecanismos microbicidas utilizados pelas células dos indivíduos SC para controlar a infecção ainda precisam ser mais investigados.

Com relação à negatização da RM e da produção de IFN- γ , já foi demonstrado que a resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- γ foram ausentes na leishmaniose cutânea recente (Rocha et al., 1999). Também já foi demonstrada a perda da resposta específica ao antígeno de *Leishmania in vitro* em indivíduos curados (Carvalho A. et al., 2013). Weigle et al., (1991) concluíram que o teste intradérmico permaneceu positivo por aproximadamente 2

anos após infecção com *L. braziliensis* e *L. panamensis* em pacientes com LC. Na LV, pacientes com o teste intradérmico negativo são classificados como susceptíveis (Abánades et al., 2012). Entretanto, outros estudos mais detalhados precisam ser feitos para tentar explicar melhor o mecanismo a respeito da negatificação destes testes.

A maioria dos estudos *in vitro* disponíveis na literatura fez uso de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) ou de isolados celulares específicos como abordagem metodológica. Tais estudos que avaliam culturas de diferentes isolados celulares são extremamente relevantes e propõem-se a averiguar o efeito de um determinado estímulo sobre um tipo celular em específico. Entretanto, muitas vezes o efeito observado nesses experimentos não se reflete *in vivo*, uma vez que, não contempla as inúmeras inter-relações celulares, já desvendadas ou ainda desconhecidas, nem as interferências dos diversos fatores moleculares presentes no meio extracelular produzidos pelos diferentes tipos celulares ou provenientes do plasma sanguíneo. Portanto, optou-se nesse trabalho pela utilização da cultura de células de sangue total (Kumar et al., 2014; Singh & Sundar, 2014) por representar uma metodologia que se aproxima mais da real situação da interação patógeno-hospedeiro (Pugliese, 2005). Entretanto, este estudo tem algumas limitações: para simplificar, analisamos apenas um valor de quimiocinas por indivíduo ao invés de usar métodos de análise de sobrevivência para incorporar os dados longitudinais. Apesar das avaliações imunológicas terem sido realizadas a cada dois anos, não foi possível determinar o tempo exato de exposição. Como o conhecimento do papel da resposta imune na patogênese da LC tem crescido rapidamente, alguns mediadores, que podem desempenhar papéis importantes no desenvolvimento da doença, tais como as metaloproteinases, IFN- γ tipo 1 e IL-1 β não foram avaliadas. No entanto, fizemos observações altamente relevantes. Especificamente, nós demonstramos que a produção de IFN- γ pelas células NK, bem como a capacidade dos

monócitos para controlar a *Leishmania*, foram os mecanismos de defesa que impedem indivíduos expostos à *L. braziliensis* de desenvolverem LC.

X. SUMÁRIO DE RESULTADOS

- a) Indivíduos que desenvolveram LC eram mais jovens do que os indivíduos SC e controles negativos e eram predominantemente estudantes. A produção de CXCL9 e CXCL10 em culturas estimuladas com antígeno de *L. braziliensis* foi maior nos indivíduos SC. Porém, indivíduos SC com RM positiva eram mais velhos, tinham mais anos residindo na área endêmica e mais tempo morando na mesma casa;
- b) Houve uma correlação direta porém fraca entre a RM e a produção de IFN- γ e foi observada uma forte correlação entre o maior diâmetro da RM e a produção de CXCL9 apesar de ter havido houve uma correlação fraca entre a RM e CXCL10;
- c) Dos 308 CF estudados, 45 (14,6%) indivíduos desenvolveram LC sendo que a taxa de infecção para a doença foi de 3,2:1. O número de indivíduos com evidência de infecção por *L. braziliensis* aumentou de 54 (17,5%) em 2010 para 118 (38,4%) em 2014;
- d) Apenas 3% dos CF que apresentaram somente produção de IFN- γ desenvolveram LC. Adicionalmente, a análise de pessoa-ano mostrou que o risco de desenvolver LC é reduzido em 85% naqueles CF que são IFN- γ (+) quando relacionado ao grupo IFN- γ (-) RM (-) e é reduzido em 32% no grupo de RM (+) em relação ao grupo RM (-) IFN- γ (-);
- e) A principal fonte de IFN- γ nos CF que tinham a RM(-) mas apresentavam produção de IFN- γ foram as células NK. Adicionalmente foi demonstrado que monócitos de

indivíduos SC tem uma capacidade aumentada de controlar a infecção por *L. braziliensis* quando comparados com monócitos de pacientes com LC;

- f) Houve negatização da RM e ausência da produção de IFN- γ em alguns contatos familiares que apresentavam evidência de resposta imune.

XI. CONCLUSÃO DO ESTUDO REALIZADO

Proteção contra a leishmaniose cutânea causada pela *L. braziliensis*, é associada com a produção de IFN- γ por células NK, resultados do teste intradérmico negativos e maior capacidade dos monócitos dos indivíduos subclínicos em controlar a infecção por *L.braziliensis*.

XII.PERSPECTIVAS DE ESTUDO

XII. 1 OBJETIVO

O objetivo principal desta proposta de estudo é avaliar em uma coorte de indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis* a resposta imune e a capacidade de controlar a infecção após longo período de exposição ao parasita.

XII. 2 JUSTIFICATIVA

O teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno solúvel de leishmania ou Reação de Montenegro (RM) tem alta sensibilidade no diagnóstico da leishmaniose cutânea (LC) causada pela *Leishmania braziliensis* e tem sido usado para a identificação de indivíduos expostos ao parasito, na ausência de doença (Guerra et al., 1985; Weigle et al., 1991; Follador et al., 1999) . É conhecido que cerca de 15% de indivíduos sadios que vivem em área endêmica de *L. braziliensis* apresentam o teste de hipersensibilidade tardia positivo, mas não tem história pregressa de leishmaniose cutânea (Follador et al., 1999; Gomes-Silva et al., 2007; Schnorr et al., 2012). Estes indivíduos têm sido considerados como portadores de infecção subclínica por *L. braziliensis*. Recentemente nós documentamos que a dosagem de IFN- γ , em cultura de células sanguíneas estimuladas por antígeno de leishmania, aumenta em 2,2 vezes a capacidade de detectar exposição ao parasito (Schnorr et al., 2012). Está bem estabelecido na literatura que o principal mecanismo de defesa contra a *Leishmania* é mediado por uma resposta do tipo Th1, caracterizada pela produção de IFN- γ que ativa os macrófagos levando conseqüentemente à destruição do parasito. Porém, na infecção por *L. braziliensis* o desenvolvimento e gravidade da lesão estão intimamente relacionados com a produção de

IFN- γ , TNF- α e ativação de células T CD8 (Bacellar et al., 2002; Antonelli et al., 2005; Faria et al., 2005; Ribeiro De Jesus et al., 2008). Nos indivíduos com LC, as células T CD4⁺ são as maiores fontes de IFN- γ (Kemp et al., 1999; Bottrel et al., 2001). A relação entre infecção por *L. braziliensis* e desenvolvimento de doença é de 3,2:1 (Muniz et al., 2016). Há seis anos estabelecemos, na área endêmica de Corte de Pedra, uma coorte com familiares saudáveis, contatos de pacientes com LC. Estes indivíduos não tinham história pregressa nem evidência de leishmaniose tegumentar. Inicialmente, estabelecemos marcadores imunológicos relacionados à exposição à leishmania. Schnorr et al., (2012) mostraram que pelo menos dois testes (hipersensibilidade tardia e produção de IFN- γ) devem ser utilizados para a detecção de infecção por *L. braziliensis*. Na continuação da coorte mostramos que ao utilizar ambos os testes como evidência de infecção por *L. braziliensis*, a probabilidade de detectar a exposição a *L. braziliensis* aumentou 2,2 vezes em relação ao uso da RM sozinha e novamente a dissociação entre a RM e a produção de IFN- γ foi mostrada. Mostramos também que, nos indivíduos que apresentaram produção de IFN- γ e que tiveram a RM negativo, este IFN- γ era predominantemente produzido por células NK. Também foi demonstrado que monócitos de indivíduos subclínicos eram menos infectados e permitiam uma menor proliferação da *L. braziliensis* do que monócitos de indivíduos com LC (Muniz et al., 2016). Entretanto, este conhecimento ainda são insuficientes para esclarecer definitivamente como os indivíduos expostos, que não desenvolvem a doença, controlam a infecção.

Nesta coorte de 308 contatos familiares de pacientes com leishmaniose cutânea, 118 (38,3%) tinham evidência de exposição à infecção por *L. braziliensis*, 45 (14,6%) desenvolveram LC e 101 (32,8%) foram considerados como portadores de infecção subclínica por *L. braziliensis*. Enquanto não encontramos evidências de que a RM se associava com proteção, o controle da infecção e conseqüentemente o não desenvolvimento da LC, estava relacionado com a produção de IFN- γ . Enquanto LC foi observada em 16,6% dos indivíduos

com RM positivo, apenas 3,0% dos contatos familiares (CF) que produziram IFN- γ e que possuíam o RM negativo desenvolveram LC. Durante o acompanhamento dos indivíduos com infecção subclínica, também mostramos que a RM se negativou em alguns indivíduos e outros deixaram de produzir IFN- γ . Em pacientes tratados para LC existe uma perda da capacidade de produzir IFN- γ , mas o teste intradérmico continua positivo sugerindo a persistência de células de memória nos tecidos e/ou a manutenção do parasito mesmo após a cura (Carvalho A. et al., 2013). Desta forma, **a nossa hipótese é que a capacidade de controlar a infecção por *L. braziliensis* é mediada pela resposta imune inata e conseqüentemente não será alterada com o passar dos anos.**

Passos et al., (2015) mostraram que monócitos CD16⁺ estão elevados na fase inicial da leishmaniose cutânea recente e podem participar da resposta inflamatória. Após a infecção *in vitro* com *L. braziliensis*, o estresse oxidativo de monócitos de pacientes com LC foi maior do que o encontrado nos monócitos de indivíduos saudáveis (Carneiro et al., 2016). Macrófagos derivados de monócitos de indivíduos com LC recorrente foram mais permissivos à entrada da *L. panamensis in vitro* do que macrófagos de indivíduos com infecção subclínica (Bosque et al., 2000). Após exposição à *L. braziliensis*, macrófagos de indivíduos SC mostraram uma menor taxa de infecção e um menor número de amastigotas intracelulares quando comparados com células de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) (Giudice et al., 2012). Além disso, os macrófagos derivados de monócitos de indivíduos SC produziam menos TNF- α do que os pacientes com LC e LM (Giudice et al., 2012). Cardoso et al., (2015) mostraram que a frequência de monócitos infectados por *L. braziliensis* foi menor nos indivíduos SC do que nos pacientes com LC. No nosso estudo os monócitos de indivíduos com infecção subclínica foram menos permissivos a penetração da leishmania do que monócitos de pacientes com LC.

As células NK representam também a primeira linha de defesa após infecção por *Leishmania* (Lieke et al., 2011; Carvalho et al., 2012). Vários estudos mostram o papel das células NK produzindo IFN- γ para ativar as células fagocíticas para matar a leishmania (Laskay et al., 1995; Maasho et al., 1998; Remer et al., 2010; Rasolzadeh et al., 2015). Na infecção por *L. mexicana* pacientes com leishmaniose difusa apresentaram uma redução do número de células NK, diminuição na produção de IFN- γ e TNF- α e menor expressão de TLR2, TLR1 e TLR6, em comparação com pacientes com LC e isso pode estar relacionado com a gravidade da doença (Cañeda-Guzmán et al., 2014). Na resposta imune inata, as células NK tem sido correlacionadas com a proteção natural e cura da leishmaniose devido a sua habilidade de secretar IFN- γ para ativar macrófagos e ajudar na preparação de uma resposta Th1 protetora (Maasho et al., 1998; Nylén et al., 2003). Também já foi mostrado que células NK ativadas estão presentes nas culturas não estimuladas de controles endêmicos que resistem à infecção por *Leishmania*, sugerindo um papel de proteção contra a LC (Maasho et al., 1998). Recentemente nós mostramos que em indivíduos subclínicos o IFN- γ produzido por células NK pode exercer um papel protetor contra a infecção por *L. braziliensis* (Muniz et al., 2016).

XII. 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar se em indivíduos com infecção subclínica haverá negatização da RM e ausência de produção de IFN- γ , 5 anos após a identificação da infecção por *L. braziliensis*.
- b) Avaliar, nos indivíduos com infecção subclínica, se a capacidade de monócitos em controlar a infecção por *L. braziliensis* será alterada com o passar dos anos.

- c) Avaliar a capacidade de células NK de destruir *in vitro* células infectadas de indivíduos subclínicos, assim como, avaliar os receptores de ativação e inibição dessas células após 5 anos de exposição a *L. braziliensis*.

XII. 4 GRUPOS DE ESTUDO

- a) Indivíduos com infecção subclínica: familiares sadios de pacientes com LC que apresentaram evidência de resposta imune ao antígeno de *Leishmania* antes do início da coorte de 5 anos;
- b) Indivíduos sadios: indivíduos não residentes da área endêmica e que não apresentaram evidência de resposta imune ao antígeno de *Leishmania*;
- c) Pacientes com LC: Pacientes residentes da área endêmica portadores de leishmaniose cutânea;

XII. 5 METODOLOGIA

*A- Reavaliação da produção de IFN- γ e repetição da Reação de Montenegro, em SC, após 5 anos da identificação de exposição à *L. braziliensis**

Serão coletados 15 ml de sangue heparinizado de cada participante antes da realização da RM. Um mL de sangue total será colocado em uma placa de 24 orifícios (Thechno Plastic Productcs AG) onde será adicionado o antígeno solúvel de *L. braziliensis* (SLA) na concentração de 20 μ g/mL. Logo após, as placa serão incubadas à 37° C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 72 horas. Após esse período será coletado o sobrenadante para dosagem do

IFN- γ através do método imunoenzimático (ELISA) utilizando-se reagentes comercialmente disponíveis da BD OptEIA™. Os resultados serão expressos em pg/ml.

O teste de RM será realizado sempre após a coleta de sangue para o teste *in vitro*, com a finalidade de evitar a possível influência da reação do teste cutâneo na resposta imune determinada *in vitro*. O teste de Montenegro será realizado utilizando antígeno solúvel de *L. braziliensis*. A quantidade de 0,1 ml do antígeno será injetada por via intradérmica no antebraço e após 48-72 horas o maior diâmetro da área de induração será medido. A reação será considerada positiva quando o diâmetro foi maior ou igual a 5 mm.

B- Avaliação da capacidade microbicida de monócitos de indivíduos subclínicos, controles sadios e pacientes com LC em controlar a infecção por L. braziliensis.

Um isolado de *L. braziliensis* será cultivado em meio Schneider suplementado com soro bovino fetal (SBF). As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) (1×10^6 cells / tubo) de indivíduos dos diferentes grupos serão obtidas a partir de sangue total heparinizado e separadas por gradiente de densidade através de Ficoll Paque™ PLUS (GE Healthcare). Após lavagens as células serão ressuspensas em meio RPMI 1640 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) suplementado com 10% de soro AB humano Rh⁺ (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) e antibióticos. Logo após, essas células serão infectadas com promastigotas na fase estacionária de *L. braziliensis* na razão de 5:1 células e incubados a 37° C in 5% CO₂. Após 2 horas, parasitos extracelulares serão removidos por centrifugação. As células restantes serão colocadas em meio RPMI 1640 suplementado com SBF e incubadas por mais 24, 48 e 72 horas. Após esse período de tempo, a porcentagem de células infectadas e o número de parasitas intracelulares serão determinados por microscopia óptica em lâminas de citocentrífuga, coradas com May-Grunwald-Giemsa. Para quantificar parasitas viáveis em

monócitos infectados após 72h, o meio de cultura será substituído por 0.5mL do meio Schneider (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB, e cultivado por 5 dias adicionais. Após esse período o número de promastigotas viáveis será avaliado nos sobrenadantes das culturas utilizando câmara de Neubauer.

C – Avaliação da capacidade de células NK de destruir in vitro células infectadas de indivíduos subclínicos, controles sadios e pacientes com LC

Purificação de células NK a partir de células mononucleares do sangue periférico

Após a coleta de sangue, as CMSP serão isoladas através de gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque) como descrito anteriormente. Após a separação das CMSP, as células NK (CD56+CD8+/CD8-CD3-) serão purificadas utilizando o kit de separação por beads magnéticas (CD56+CD8+/CD8- NK Cell Isolation Kit, human, Milteny Biotec) de acordo com as recomendações do fabricante. Após separação, as células NK serão colocadas por 12 horas a 37°C e 5% de CO₂ em co-cultura com os monócitos infectados com *L.braziliensis* na proporção de 5:1 NK/monócitos dos grupos avaliados. Esta proporção foi calculada considerando 10% de monócitos no sangue periférico. Após 12 horas, as CMSP infectadas em co-cultura com células NK serão lavadas e o meio trocado para Schneider (Sigma Aldrch, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB 12657 Gibco Laboratories, Invitrogen™ América do Sul) e 2% de urina estéril e mantido a 27°C a 5% de CO₂ por 24 horas. A quantificação das promastigotas viáveis será feita através da técnica de microscopia óptica em câmara de Newbauer (Britto et al, 2015).

XII. 6 REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS

1. ANTONELLI, L. R.; DUTRA, W. O.; ALMEIDA, R. P.; et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis.

- Immunol Lett**, v. 101, n. 2, p. 226–230, 2005.
2. BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.
 3. BOSQUE, F.; SARAIVA, N. G.; VALDERRAMA, L.; MILON, G. Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. **Scand J Immunol**, v. 51, n. 5, p. 533–541, 2000.
 4. BOTTREL, R. L.; DUTRA, W. O.; MARTINS, F. A.; et al. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 69, n. 5, p. 3232–3239, 2001.
 5. BRITTO, T.M.C.C. Dicotomia funcional de células NK na leishmaniose cutânea: participação na patogênese e destruição de parasitos. Tese doutorado. **Universidade Federal da Bahia**. Faculdade de Medicina da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Salvador (2015);
 6. CAÑEDA-GUZMÁN, I. C.; SALAIZA-SUAZO, N.; FERNÁNDEZ-FIGUEROA, E. A.; et al. NK cell activity differs between patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana*: A comparative study of TLRs and cytokines. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.
 7. CARDOSO, T. M.; MACHADO, A.; COSTA, D. L.; et al. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. **Infect Immun**, v. 83, n. 3, p. 898–906, 2015.
 8. CARNEIRO, P. P.; CONCEIÇÃO, J.; MACEDO, M.; et al. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. (S. Stäger, Ed.) **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148084, 2016. Public Library of Science.
 9. CARVALHO, A. M.; MAGALHÃES, A.; CARVALHO, L. P.; et al. Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 529, 2013.
 10. CARVALHO, L. P.; PASSOS, S.; SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. OCT, p. 1–9, 2012.
 11. FARIA, D. R.; GOLLOB, K. J.; BARBOSA JR., J.; et al. Decreased in situ

- expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 73, n. 12, p. 7853–7859, 2005.
12. FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; CARDOSO, M. A.; et al. [Outbreak of American cutaneous leishmaniasis in Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, n. 5, p. 497–503, 1999.
 13. GIUDICE, A.; VENDRAME, C.; BEZERRA, C.; et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infect Dis**, v. 12, p. 75, 2012.
 14. GOMES-SILVA, A.; CÁSSIA BITTAR, R. DE; SANTOS NOGUEIRA, R. DOS; et al. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, n. 3, p. 440–444, 2007.
 15. KEMP, K.; THEANDER, T. G.; HVIID, L.; et al. Interferon-gamma- and tumour necrosis factor-alpha-producing cells in humans who are immune to cutaneous leishmaniasis. **Scandinavian journal of immunology**, v. 49, n. 6, p. 655–9, 1999.
 16. LASKAY, T.; DIEFENBACH, A.; RÖLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. **European journal of immunology**, v. 25, n. 8, p. 2220–7, 1995.
 17. LIEKE, T.; NYLÉN, S.; EIDSMO, L.; et al. The interplay between *Leishmania* promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct lysis of *Leishmania* by NK cells and modulation of NK cell activity by *Leishmania* promastigotes. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1898–909, 2011.
 18. MAASHO, K.; SANCHEZ, F.; SCHURR, E.; HAILU, A.; AKUFFO, H. Indications of the Protective Role of Natural Killer Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity. , v. 66, n. 6, p. 2698–2704, 1998.
 19. GUERRA, M.O.P.; FURTADO, T.; BARROS, G.C.; SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.D.; Infecção subclínica na leishmaniose tegumentar americana. 1985. Anais Bra Dermatologia.
 20. MUNIZ, A. C.; BACELLAR, O.; LAGO, E. L.; et al. Immunologic Markers of Protection in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection: A 5-Year Cohort Study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 4, p. 570–6, 2016.
 21. NYLÉN, S.; MAASHO, K.; SÖDERSTRÖM, K.; ILG, T.; AKUFFO, H. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to

- produce interferon-gamma. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 131, n. 3, p. 457–467, 2003.
22. PASSOS, S.; CARVALHO, L. P.; COSTA, R. S.; et al. Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *leishmania braziliensis* infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 2, p. 274–282, 2015.
23. RASOLZADEH, S.; HAJI FATAHALIHA, M.; HOSSEINI, M.; et al. Recombinant LPG3 stimulates IFN- γ and TNF- α secretion by human NK cells. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 10, n. 4, p. 554–560, 2015.
24. REMER, K. A.; ROEGER, B.; HAMBRECHT, C.; MOLL, H. Natural killer cells support the induction of protective immunity during dendritic cell-mediated vaccination against *Leishmania major*. **Immunology**, v. 131, n. 4, p. 570–82, 2010.
25. RIBEIRO DE JESUS, A.; LUNA, T.; PACHECO DE ALMEIDA, R.; MACHADO, P. R. L.; CARVALHO, E. M. Pentoxifylline down modulate in vitro T cell responses and attenuate pathology in Leishmania and HTLV-I infections. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 10, p. 1344–1353, 2008.
26. SCHNORR, D.; MUNIZ, A. C.; PASSOS, S.; et al. IFN-gamma production to leishmania antigen supplements the leishmania skin test in identifying exposure to *L. braziliensis* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 12, p. e1947, 2012.
27. WEIGLE, K. A.; VALDERRAMA, L.; ARIAS, A. L.; SANTRICH, C.; SARAVIA, N. G. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 3, p. 260–271, 1991.

XIII. ABSTRACT

IMMUNOLOGICAL MARKERS OF PROTECTION IN THE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* INFECTION: A COHORT STUDY. **Introduction:** Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common clinical form of leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. Ten to 15% of healthy individuals living in an endemic area of *Leishmania* without previous history of CL have a positive skin test for soluble antigen of leishmania (SLA) and are considered to have subclinical (SC) form of the disease. The mechanisms involved in the control of SC *L. braziliensis* infection are unknown. **Aim:** To determine immunological factors associated with the development of SC infection or CL in exposed individuals to *Leishmania braziliensis* infection. **Methods:** A cohort of 308 household contacts (HC) of patients with CL without disease history was established in 2010 in an endemic area of cutaneous leishmaniasis. The subjects were followed for five years and clinical and immunological evaluations were performed. Evaluation of IFN- γ and chemokines production in whole blood cultures stimulated with SLA and the delay hypersensitivity test (DTH) was performed at the years zero, two and four. The identification of cells producing IFN- γ was performed by flow cytometry and was determined the ability of monocytes to control *Leishmania* infection. During the period of evaluation the subjects were monitored to identify the development of the disease. **Results:** *L. braziliensis* infection was detected in 118 (38.3%) HC. CL was documented in 45 (14.6%) patients, 101 (32.8%) had SC infection and 162 (52.6%) had no evidence of exposure to *L. braziliensis*. The infection rate for the disease was 3.2:1 and only 3% of those who just presented IFN- γ production developed CL. There was a direct correlation but a fair agreement between DTH test and IFN- γ production [κ : 0.23 (95% CI: 0.12 to 0.35)]. While the IFN- γ production by NK cells was associated with protection, a positive DTH did not prevent development of the disease. Monocyte of SC individuals can control the infection more than monocyte of CL patients. We found negativation of the DTH test and IFN- γ production. **Conclusions:** CL protection was associated with IFN- γ production by NK cells, the negative intradermal skin test results and higher capacity of monocytes of SC individuals control of *L. braziliensis* infection.

KEYWORDS: 1. Cutaneous leishmaniasis; 2. Subclinical infection by *L. braziliensis*; 3. intradermal test with antigen of leishmania (Montenegro reaction); 4. Chemokines. 5. Cohort

XIV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABÁNADES, D.R.; ARRUDA, L.V.; ARRUDA, E.S.; PINTO, J.R.; PALMA, M.S.; AQUINO, D.; CALDAS, A.J.; SOTO, M.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; Immunodominant antigens of *Leishmania chagasi* associated with protection against human visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.**6(6):e1687. 2012
2. AKUFFO, H.; MAASHO, K.; HOWE, R. Natural and acquired resistance to *Leishmania*: cellular activation by *Leishmania aethiopica* of mononuclear cells from unexposed individuals is through the stimulation of natural killer (NK) cells. **Clin Exp Immunol**, v. 94, n. 3, p. 516–521, 1993.
3. ALMEIDA, M. C. DE; CARDOSO, S. A.; BARRAL-NETTO, M. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 2, p. 153–162, 2003.
4. ANTONELLI, L. R.; DUTRA, W. O.; ALMEIDA, R. P.; et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunol Lett**, v. 101, n. 2, p. 226–230, 2005.
5. ANTONELLI, L. R. V; DUTRA, W. O.; ALMEIDA, R. P.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K. J. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 136, n. 2, p. 341–348, 2004.
6. ASSREUY, J.; CUNHA, F.Q.; EPPERLEIN, M.; NORONHA-DUTRA, A.; O'DONNELL, C.A.; LIEW, F.Y.; MONCADA, S.; Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. **Eur J Immunol.**; 24(3): 672–6. 1994.
7. AZAMBUJA, R.; SAMPAIO, R. N.; MARSDEN, P. D. [Current aspects of endemic mucocutaneous leishmaniasis in Brazil]. **Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete**, v. 36, n. 9, p. 531–3, 1985.
8. BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.
9. BADARO, R.; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 154, n. 6, p. 1003–11, 1986.
10. BAHRAMI, F.; DARABI, H.; RIAZI-RAD, F.; et al. FOXP3 expression and frequency of regulatory T cells in healed individuals from *Leishmania major* infection and the asymptomatic cases. **Human Immunology**, v. 75, n. 10, p. 1026–1033, 2014. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics.
11. BARTHELMANN, J.; NIETSCH, J.; BLESSENOHL, M.; et al. The protective Th1 response in mice is induced in the T-cell zone only three weeks after infection with *Leishmania major* and not during early T-cell activation. **Medical Microbiology and**

Immunology, v. 201, n. 1, p. 25–35, 2012.

12. BIELECKI, B.; JATCZAK-PAWLIK, I.; WOLINSKI, P.; BEDNAREK, A.; GLABINSKI, A. Central Nervous System and Peripheral Expression of CCL19, CCL21 and Their Receptor CCR7 in Experimental Model of Multiple Sclerosis. **Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis**, v. 63, n. 5, p. 367–76, 2015.
13. BITTAR, R. C.; NOGUEIRA, R. S.; VIEIRA-GONÇALVES, R.; et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 625–30, 2007.
14. BITTENCOURT, A.; BARRAL, A.; JESUS, A. R. DE; et al. In situ identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 4, p. 585–586, 1989. Fundação Oswaldo Cruz.
15. BLOS, M.; SCHLEICHER, U.; SOARES ROCHA, F.J.; MEISSNER, U.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. **Eur J Immunol.**;33(5):1224–34. 2003.
16. BONFANTE-GARRIDO, R.; BARROETA, S.; ALEJOS, M. A. DE; et al. Disseminated American cutaneous leishmaniasis. **International journal of dermatology**, v. 35, n. 8, p. 561–5, 1996.
17. BOSQUE, F.; SARAVIA, N. G.; VALDERRAMA, L.; MILON, G. Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. **Scand J Immunol**, v. 51, n. 5, p. 533–541, 2000.
18. BOROUJENI, M.A.; AMINJAVAHARI, M.; MOSHTAGHIAN, B.; MOMENI, A.; MOMENI, A. Z. Reevaluating leishmanin skin test as a marker for immunity against cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*, v. 52, n. 7, p. 827–830, 2013.
19. BOTTREL, R. L.; DUTRA, W. O.; MARTINS, F. A.; et al. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 3232–3239, 2001.
20. BRANDONISIO, O.; PANARO, M. A.; FUMAROLA, I.; et al. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. **Clinical and experimental medicine**, v. 2, n. 3, p. 125–129, 2002.
21. BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância em saúde : zoonoses**. 2009. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_saude_zoonoses_p1.pdf>.
22. _____. Portal Saúde. **Casos de LTA**. 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf>
23. CAMERA, P. D O.; JUNGER, J.; PIRES, F. D E. S. S.; et al. Haematogenous

- dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 12, p. 1112–1117, 2006.
24. CAMPANELLI, A. P.; BRODSKYN, C. I.; BOAVENTURA, V.; et al. Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. **Human Immunology**, v. 71, n. 12, p. 1220–1227, 2010. Elsevier Inc.
 25. CARDOSO, T. M.; MACHADO, A.; COSTA, D. L.; et al. Protective and pathological functions of CD8⁺ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, p. 898–906, 2015.
 26. CARNEIRO, P. P.; CONCEIÇÃO, J.; MACEDO, M.; et al. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. (S. Stäger, Ed.) **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148084, 2016. Public Library of Science.
 27. CARNEIRO, P. P.; Avaliação dos mecanismos envolvidos na morte da *Leishmania braziliensis* por monócitos de pacientes com Leishmaniose tegumentar americana. (Disertação de Mestrado). **Universidade Federal da Bahia**, Salvador, Bahia. 2013.
 28. CARVALHO, A. M.; MAGALHÃES, A.; CARVALHO, L. P.; et al. Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 529, 2013.
 29. CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 56, n. 4, p. 315–25, 1994.
 30. _____, E. M.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. **The Journal of infectious diseases**, v. 165, n. 3, p. 535–40, 1992.
 31. CARVALHO, L. P.; PASSOS, S.; SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. OCT, p. 1–9, 2012.
 32. CERF, B. J.; JONES, T. C.; BADARO, R.; et al. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 156, n. 6, p. 1030–3, 1987.
 33. CHILAMA, M.R.; GONGORA, R. E.; VALDERRAMA, L.; et al. Parasitological Confirmation and Analysis of Leishmania Diversity in Asymptomatic and Subclinical Infection following Resolution of Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1–20, 2015.
 34. COLMENARES, M.; KIMA, P. E.; SAMOFF, E.; SOONG, L.; MCMAHON-PRATT, D. Perforin and gamma interferon are critical CD8⁺ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3172–3182, 2003.
 35. CONCEIÇÃO, J.; DAVIS, R.; CARNEIRO, P. P.; et al. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **PLoS**

neglected tropical diseases, v. 10, n. 5, p. e0004715, 2016.

36. CONRAD, S. M.; STRAUSS-AYALI, D.; FIELD, A. E.; MACK, M.; MOSSER, D. M. Leishmania-derived murine monocyte chemoattractant protein 1 enhances the recruitment of a restrictive population of CC chemokine receptor 2-positive macrophages. **Infection and immunity**, v. 75, n. 2, p. 653–65, 2007.
37. CONTER, C. C.; NEITZKE-ABREU, H. C.; PEDROSO, R. B.; MARA, S.; ARISTIDES, A. Detection of *Leishmania* (*Viannia*) DNA in leucocytes from the blood of patients with cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 196, p. 626–628, 2015.
38. CONVIT, J.; ULRICH, M.; FERNÁNDEZ, C. T.; et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 444–8, 1993.
39. COSTA, J. M. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil/Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil. **Gazeta Médica da Bahia** . v. 75, p.3–17, 2005.
40. CURTI, M. C. M.; SILVEIRA, T. G. V; ALESSI, S. M.; et al. Epidemiological and clinical characteristics of cutaneous leishmaniasis and their relationship with the laboratory data , south of Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 12–16, 2011.
41. DA-CRUZ, A. M.; BITTAR, R.; MATTOS, M.; et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 2, p. 251–6, 2002.
42. DAVIES, C. R.; LLANOS-CUENTAS, E. A.; PYKE, S. D.; DYE, C. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. **Epidemiol Infect**, v. 114, n. 2, p. 297–318, 1995.
43. DELGADO, N.J.; CASTELLS, C.C.; GARCÍA, C.MÁ.; SÁEZ, L.I.; Comparative performance of QuantiFERON(®)-TB Gold IT versus tuberculin skin test among contact investigations for latent tuberculosis infection. **Medicina Clínica (Barcelona)**. 2011 Sep 17;137(7):289-96. Epub 2011 Apr 27.
44. DETJEN, A. K.; LOEBENBERG, L.; GREWAL, H. M. S.; et al. Short-term reproducibility of a commercial interferon gamma release assay. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 8, p. 1170–1175, 2009.
45. EVANS, T.G.; THAI, L.; GRANGER, D.L.; HIBBS, J.B. Jr.; Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. **J Immunol**. Jul 15;151(2):907-15. 1993;
46. FARIA, D. R.; GOLLOB, K. J.; BARBOSA JR., J.; et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 73, n. 12, p. 7853–7859, 2005.
47. FARIA, D. R.; SOUZA, P. E. A.; DUR??ES, F. V.; et al. Recruitment of CD8+ T cells

- expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 432–439, 2009.
48. FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; BACELLAR, O.; et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 11, p. E54–8, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015707>>. .
 49. _____.; ARAUJO, C.; CARDOSO, M. A.; et al. [Outbreak of American cutaneous leishmaniasis in Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brazil]. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 497–503, 1999.
 50. FRANCA-COSTA, J.; WEYENBERGH, J. VAN; BOAVENTURA, V. S.; et al. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. **Journal Infectious Diseases**, v. 211, n. 3, p. 426–435, 2015.
 51. GIUDICE, A.; VENDRAME, C.; BEZERRA, C.; et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, p. 75, 2012.
 52. GOMES-SILVA, A.; CASSIA BITTAR, R. DE; SANTOS NOGUEIRA, R. DOS; et al. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clinical Experimental Immunology**, v. 149, n. 3, p. 440–444, 2007.
 53. GOMES-SILVA, A.; CÁSSIA BITTAR, R. DE; SANTOS NOGUEIRA, R. DOS; et al. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, n. 3, p. 440–444, 2007.
 54. GONG, L.-L.; ZHAO, B.-B.; FAN, W.-F.; et al. Correlations of IFN- γ -inducible protein-10 with the risk of chronic hepatitis B and the efficacy of interferon therapy in Asians. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 7, p. 8367–75, 2015.
 55. GONTIJO, B. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. **Medicina Tropical**, v. 36, n. 13, p. 71–80, 2003.
 56. GONZÁLEZ, A.; BIAGI, F. Asymptomatic infections in Mexican cutaneous leishmaniasis. **Dermatologia internationalis**, v. 7, n. 1, p. 8–9, 1968.
 57. GORAK, P. M.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **European journal of immunology**, v. 28, n. 2, p. 687–95, 1998.
 58. GREEN, S. J.; NACY, C. A; MELTZER, M. S. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. **Journal of leukocyte biology**, v. 50, n. 1, p. 93–103, 1991.
 59. GRIMALDI, G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687–725, 1989.

60. GUERRA, M.O.P.; FURTADO, T.; BARROS, G.C.; SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.D.; Infecção subclínica na leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 60 (6): 365-369, 1985.
61. GUERRA, C.S.; SILVA, R.M.; CARVALHO, L.O.; CALABRESE, K.S.; BOZZA, P.T.; CÔRTE-REAL, S.; Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. **Int J Exp Pathol**. Oct;91(5):451-9. 2010
62. GUERREIRO, J. B.; SANTOS, S. B.; MORGAN, D. J.; et al. Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. **Clinical and experimental immunology**, v. 145, n. 2, p. 296–301, 2006.
63. HAILU, A.; POLL, T. VAN DER; BERHE, N.; KAGER, P. A. Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, n. 5, p. 561–567, 2004.
64. JONES, T. C.; JOHNSON, W. D.; BARRETTO, A. C.; et al. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania braziliensis* brasiliensis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 156, n. 1, p. 73–83, 1987.
65. KAMMOUN-REBAI, W.; NAOUAR, I.; LIBRI, V.; et al. Protein biomarkers discriminate *Leishmania major* -infected and non-infected individuals in areas endemic for cutaneous leishmaniasis. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 138, 2016. BMC Infectious Diseases.
66. KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
67. KEMP, K.; THEANDER, T. G.; HVIID, L.; et al. Interferon-gamma- and tumour necrosis factor-alpha-producing cells in humans who are immune to cutaneous leishmaniasis. **Scandinavian journal of immunology**, v. 49, n. 6, p. 655–9, 1999.
68. KHAIBOULLINA, S. F.; GUMEROVA, A. R.; KHAFIZOVA, I. F.; et al. CCL27: Novel Cytokine with Potential Role in Pathogenesis of Multiple Sclerosis. **BioMed research international**, v. 2015, p. 189638, 2015.
69. KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and veterinary entomology**, v. 4, n. 1, p. 1–24, 1990.
70. KUMAR, R.; SINGH, N.; GAUTAM, S.; et al. Leishmania Specific CD4 T Cells Release IFN- γ That Limits Parasite Replication in Patients with Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.
71. LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 569–96, 1983.
72. LASKAY, T.; DIEFENBACH, A.; RÖLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 8, p. 2220–2227, 1995.

73. LEMOS, M. P.; ESQUIVEL, F.; SCOTT, P.; LAUFER, T. M. MHC class II expression restricted to CD8alpha+ and CD11b+ dendritic cells is sufficient for control of *Leishmania major*. **The Journal of experimental medicine**, v. 199, n. 5, p. 725–30, 2004.
74. LEOPOLDO, P. T. G.; MACHADO, P. R. L.; ALMEIDA, R. P.; et al. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. **BMC infectious diseases**, v. 6, p. 75, 2006.
75. LESSA, H. A.; MACHADO, P.; LIMA, F.; et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 2, p. 87–89, 2001.
76. LESSA, M. M.; LESSA, H. A.; CASTRO, T. W. N.; et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 6, p. 843–847, 2007.
77. LIEKE, T.; NYLÉN, S.; EIDSMO, L.; et al. The interplay between *Leishmania* promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct lysis of *Leishmania* by NK cells and modulation of NK cell activity by *Leishmania* promastigotes. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1898–909, 2011.
78. LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 145, n. 12, p. 4306–4310, 1990 (a)
79. _____; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 144, n. 12, p. 4794–7, 1990 (b)
80. LIMA, I. D.; QUEIROZ, J. W.; LACERDA, H. G.; et al. *Leishmania infantum chagasi* in Northeastern Brazil: Asymptomatic infection at the urban perimeter. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 1, p. 99–107, 2012.
81. LLANOS CUENTAS, E. A.; CUBA, C. C.; BARRETO, A. C.; MARSDEN, P. D. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis* infections. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 78, n. 6, p. 845–846, 1984.
82. LOUZIR, H.; MELBY, P. C.; SALAH, A. BEN; et al. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **J Infect Dis**, v. 177, n. 6, p. 1687–1695, 1998.
83. MAASHO, K.; SANCHEZ, F.; SCHURR, E.; HAILU, A.; AKUFFO, H. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. **Infection and immunity**, v. 66, n. 6, p. 2698–704, 1998.
84. MACHADO, A.; EMODI, K.; TAKENAMI, I.; et al. Analysis of discordance between the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 13, n. 4, p. 446–453, 2009.

85. MACHADO, P.; ARAÚJO, C.; SILVA, A. T. DA; et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 34, n. 12, p. E69–73, 2002.
86. _____.; CARVALHO, A. M.; MACHADO, G. U.; DANTAS, M. L.; ARRUDA, S. Development of cutaneous leishmaniasis after leishmania skin test. **Case reports in medicine**, v. 2011, p. 631079, 2011.
87. _____.; LESSA, H.; LESSA, M.; et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v. 44, n. 6, p. 788–793, 2007.
88. MAHOMED, H.; HUGHES, E. J.; HAWKRIDGE, T.; et al. Comparison of Mantoux skin test with three generations of a whole blood IFN- γ assay for tuberculosis infection. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 10, n. 3, p. 310–316, 2006.
89. MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis ("espundia"; Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 6, p. 859–76, 1986.
90. MARTÍN-FONTECHA, A.; THOMSEN, L. L.; BRETT, S.; et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. **Nature immunology**, v. 5, n. 12, p. 1260–5, 2004.
91. MASCARENHAS, R. E.; BARBOSA, G.; CLARE, J.; et al. Peripheral Blood Mononuclear Cells from Individuals Infected with Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Have a Reduced Capacity To Respond to Recall Antigens. **Society**, v. 13, n. 5, p. 547–552, 2006.
92. MELBY, P. C. Vaccination against cutaneous leishmaniasis: current status. **Am J Clin Dermatol**, v. 3, n. 8, p. 557–570, 2002.
93. MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunology Review**, v. 240, n. 1, p. 286–296, 2011.
94. MÜLLER, K.; ZANDBERGEN, G. VAN; HANSEN, B.; et al. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical microbiology and immunology**, v. 190, n. 1-2, p. 73–6, 2001.
95. MURRAY, H. W.; RUBIN, B. Y.; ROTHERMEL, C. D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon- γ is the activating lymphokine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 72, n. 4, p. 1506–1510, 1983.
96. NOVAIS, F. O.; CARVALHO, L. P.; GRAFF, J. W.; et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. **PLoS Pathology**, v. 9, n. 7, p. e1003504, 2013.
97. NOVAIS, F. O.; NGUYEN, B. T.; BEITING, D. P.; et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **J Infect Dis**, v. 209, n. 8, p. 1288–1296, 2014.
98. NOVOA, R.; BACELLAR, O.; NASCIMENTO, M.; et al. IL-17 and Regulatory

- Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 2, p. 132–136, 2011.
99. NYLÉN, S.; MAASHO, K.; SÖDERSTRÖM, K.; ILG, T.; AKUFFO, H. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 131, n. 3, p. 457–467, 2003.
 100. OLIVEIRA, W. N.; RIBEIRO, L. E.; SCHRIEFFER, A.; et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 127–132, 2014.
 101. OZTÜRK, N.; SÜRÜCÜOĞLU, S.; OZKÜTÜK, N.; et al. [Comparison of interferon-gamma whole blood assay with tuberculin skin test for the diagnosis of tuberculosis infection in tuberculosis contacts]. **Mikrobiyoloji bülteni**, v. 41, n. 2, p. 193–202, 2007.
 102. PASSOS, S.; CARVALHO, L. P.; COSTA, R. S.; et al. Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *Leishmania braziliensis* infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 2, p. 274–282, 2015.
 103. PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 127, n. 4, p. 1438–1443, 1981.
 104. PENIDO, C.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; BOZZA, M. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 12, p. 6788–94, 2003.
 105. PUGLIESE, L.S. Estudo da resposta imune a *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*: produção de IL-10 e IFN- γ em cultura de células de sangue total e níveis séricos de de IgG anti *Porphyromonas gingivalis* em portadores de periodontite crônica. 2005. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de pós Graduação em Imunologia. **PPGIm**. Universidade Federal da Bahia.
 106. QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG, L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Infectious Immunity**, v. 72, n. 2, p. 988–995, 2004.
 107. RASOLZADEH, S.; HAJI FATAHALIHA, M.; HOSSEINI, M.; et al. Recombinant LPG3 stimulates IFN- γ and TNF- α secretion by human NK cells. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 10, n. 4, p. 554–560, 2015.
 108. REED, S. G.; BADARO, R.; MASUR, H.; et al. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 35, n. 1, p. 79–85, 1986.
 109. REMER, K. A.; ROEGER, B.; HAMBRECHT, C.; MOLL, H. Natural killer cells support the induction of protective immunity during dendritic cell-mediated vaccination against *Leishmania major*. **Immunology**, v. 131, n. 4, p. 570–582, 2010.

110. RIBEIRO, J. M. C. Role of Saliva in Blood-Feeding by Arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 463–478, 1987.
111. RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 143–148, 1998.
112. RIDLEY, D. S.; MARSDEN, P. D.; CUBA, C. C.; BARRETO, A. C. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 4, p. 508–14, 1980.
113. RITTER, U.; KÖRNER, H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 6, p. 295–301, 2002.
114. ROBLEDO, S.; WOZENCRAFT, A.; VALENCIA, A. Z.; SARAVIA, N. Human monocyte infection by *Leishmania (Viannia) panamensis*. Role of complement receptors and correlation of susceptibility *in vitro* with clinical phenotype. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 152, n. 3, p. 1265–76, 1994.
115. ROCHA, P. N.; ALMEIDA, R. P.; BACELLAR, O.; et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 180, n. 5, p. 1731–4, 1999.
116. ROMA, E.H.; MACEDO, J.P.; GOES, G.R.; GONÇALVES, J.L.; CASTRO, W.; CISALPINO, D.; VIEIRA, L.Q.; Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. **Parasit Vectors**. Apr 7;9:193. 2016;
117. ROSTAMI, M. N.; KESHAVARZ, H.; EDALAT, R.; et al. CD8+ T cells as a source of IFN- γ production in human cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, 2010.
118. ROT, A.; ANDRIAN, U. H. VON. C.; Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic Chemokines Grammar for Immune Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 891–928, 2004.
119. SALAH, A. BEN; LOUZIR, H.; CHLIF, S.; et al. The predictive validity of naturally acquired delayed-type hypersensitivity to leishmanin in resistance to *Leishmania major*-associated cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 11, p. 1981–1987, 2005.
120. SALINAS, C.; BALLAZ, A.; DIEZ, R.; et al. [Study of contacts in children and adolescents using the QuantiFERON®-TB Gold In-Tube]. **Anales de pediatria (Barcelona, Spain : 2003)**, v. 74, n. 6, p. 363–70, 2011. Elsevier.
121. SANTOS, C. DA S.; BOAVENTURA, V.; RIBEIRO CARDOSO, C.; et al. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **The Journal of investigative dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1533–40, 2013.
122. SASSI, A.; LOUZIR, H.; SALAH, A. BEN; et al. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. **Clinical and Experimental**

- Immunology**, v. 116, n. 1, p. 127–132, 1999.
123. SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 2, p. 567–577, 1993.
 124. SCHNORR, D.; MUNIZ, A. C.; PASSOS, S.; et al. IFN- γ production to leishmania antigen supplements the leishmania skin test in identifying exposure to *L. braziliensis* infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 12, p. e1947, 2012.
 125. SCHRIEFER, A.; GUIMARAES, L. H.; MACHADO, P. R.; et al. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 6, p. 871–876, 2009.
 126. SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Whole blood assay and visceral leishmaniasis: Challenges and promises. **Immunobiology**, v. 219, n. 4, p. 323–328, 2014. Elsevier GmbH.
 127. SOUSA-FRANCO, J.; ARAUJO-MENDES, E.; SILVA-JARDIM, I.; L-SANTOS, J.; FARIA, D.R.; DUTRA, W.O.; HORTA, M.F.; Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. **Microbes Infect.** 8(2):390–400. 2006;
 128. RIVASTAVA S.; PANDEY S.P.; JHA M.K.; CHANDEL H.S.; SAHA B.; Leishmania expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. **Clin Exp Immunol.** Jun;172(3):403-9. 2013.
 129. STEBUT, E. VON; BELKAID, Y.; JAKOB, T.; SACKS, D. L.; UDEY, M. C. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-Leishmania immunity. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 8, p. 1547–52, 1998.
 130. TEIXEIRA, M. J.; TEIXEIRA, C. R.; ANDRADE, B. B.; et al. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 1, p. 32–40, 2006. Elsevier.
 131. TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. C. The role of vector saliva in transmission of vector-borne disease. **Parasitol.Today**, v. 6, n. 5, p. 157–160, 1990.
 132. TURETZ, M. L.; MACHADO, P. R.; KO, A. I.; et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829–34, 2002.
 133. TURGAY, N.; BALCIOGLU, I. C.; TOZ, S. O.; OZBEL, Y.; JONES, S. L. Short report: Quantiferon-Leishmania as an epidemiological tool for evaluating the exposure to *Leishmania* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 4, p. 822–824, 2010.
 134. VENUPRASAD, K.; CHATTOPADHYAY, S.; SAHA, B. CD28 signaling in neutrophil induces T-cell chemotactic factor(s) modulating T-cell response. **Human Immunology**, v. 64, n. 1, p. 38–43, 2003.

135. WEIGLE C.; MARTINEZ, F.; VALDERRAMA, L.; SARAVIA, N., K.; S. Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A longitudinal Study of the natural History, Prevalence and Incidence of Infection and Clinical Manifestations. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 168, p. 699–708, 1993.
136. WEIGLE, K.A.; VALDERRAMA, L.; ARIAS, A. L.; SANTRICH, C.; SARAVIA, N. G. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 3, p. 260–271, 1991.
137. WEIRATHER, J. L.; JERONIMO, S. M.; GAUTAM, S.; et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 11, p. 3892–3904, 2011.
138. WHO. World Health Organization technical report series **Control de las leishmaniasis**. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis I ed. Geneva, 22–26 March 2010.
139. _____ WORLD HEALTH ORGANIZATION **Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014**. 2016 (a). Disponível em: <http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf?ua=1>. Acesso em 29/07/2016.
140. _____ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. (b) Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/#>. Acesso em: 29/7/2016.
141. _____ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record**. v. 91, n. 22, p. 285–296, 2016. (c) Disponível em: <http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf?ua=1>. Acesso em: 29/7/2016.
142. YONEDA, T. [Relation between malnutrition and cell-mediated immunity in pulmonary tuberculosis]. **Kekkaku : [Tuberculosis]**, v. 64, n. 10, p. 633–40, 1989.

XVI. ANEXOS

ANEXO 1. MODELO DO QUESTIONÁRIO**Posto de Saúde de Corte de Pedra****(ILCF)****VISITA DE CAMPO*****Caso Índice*****TMRC Brasil
Projeto Leishmaniose Tegumentar****3. Número do ILCF 1 1 1 1 1 1 1*****4. Número do LTCP 1 1 1 1 1 1 1 (*) Campos obrigatórios****SIM – Serviço de Imunologia****Hospital Universitário Professor Edgard Santos - UFBA**

Data da visita* (dd/mm/aaaa): / /

4. N° do LTCP 3. N° do ILCF * 5. N° da Família

6. N° do indivíduo na Família *

Data da assinatura do TCLE para Estudo de incidência de LC e resposta imune:..... / /

Dados Demográficos

14. Sexo:..... masculino feminino

15. Data de nascimento* (dd/mm/aaaa):..... / /

16. Naturalidade: _____ 17. Ocupação:

Trabalhador rural Dona de casa Estudante Comerciante Motorista Outra

18. Cidade/Vilarejo* _____

19. Tempo em endereço atual (anos):..... ,

20. N° de moradores no domicílio (exceto paciente):.....

21. N° de moradores no domicílio com leishmaniose passada ou ativa:.....

191. Grau de parentesco com o caso índice:..... Pai/mãe Irmão Filho Outro

História Médica Progressa

192. Leishmaniose cutânea ativa:..... não sim

Se “não” ir para item 200. Se “sim” preencher também itens 193 a 199 e 52 a 71.

193. Já esteve no PSCP?..... não sim

194. Local da lesão: Segmento cefálico Tronco MMSS MMII Genitália/glúteo

195. N° de cicatrizes sugestivas de leishmaniose:.....

196. Lesões acima da cintura:..... não sim

197. Ano de início da lesão cutânea: _____

198. Tratado (antimonial) lesão cutânea:..... não sim

199. Completou o tratamento:..... não sim em curso

200. Leishmaniose mucosa:..... não sim

Se “não” ir para item 171. Se “sim” preencher também itens 201 a 203.

201. Ano de diagnóstico da lesão mucosa: _____

202. Tratada (antimonial) lesão mucosa:..... não sim

203. Completou o tratamento da lesão mucosa:..... não sim em curso

Exposição Ambiental

171. Voce já trabalhou ou morou (pelo menos um mês) em fazenda?..... não sim

172. Possui animais em casa?..... não sim

4. N° do LTCP | | | | | | | 3. N° do TMRC | | | | | | |* 5. N° da Família | | | | |

Exposição Ambiental (Continuação)

Se “não” possui animais em casa, ir para item 179. Se “sim”, especifique:

173. Cachorros.....0 não 1 sim
 174. Cavalos.....0 não 1 sim
 175. Galinhas.....0 não 1 sim
 176. Porcos.....0 não 1 sim
 177. Outros.....0 não 1 sim
 178. Se “outros”, especifique: _____

179. Há eletricidade em casa?0 não 1 sim
 180. Há sanitário em casa?.....0 não 1 sim
 181. Usa mosquiteiro para dormir?.....0 não 1 sim
 182. Há resto de mata próximo a casa (raio de 100 m).....0 não 1 sim
 183. Há roça próxima a casa (raio de 50 metros)?.....0 não 1 sim
 184. Há galinheiro próximo a casa (raio de 50 metros)?.....0 não 1 sim
 185. Há pocilga próxima a casa (raio de 50 metros)?0 não 1 sim
 186. Há curral próximo a casa (raio de 50 metros)?0 não 1 sim

187. Ocupação entre 16:00 e 24:00 hs:.....0 Permanece em casa 1 Sai de casa
 188. Se “Sai de casa”, sai para:
 0 Caçar/pescar.....1 Estudo/trabalho.....2 Outro
 189. Se “Sai de casa para outro”, especifique: _____

Exame Físico Médico (preencher itens 52 a 71, se respondeu “sim” no item 192)

52. N° total de lesões de pele:.....| | | | |
 53. Tempo de duração da lesão ativa (semanas):.....| | | | |

Número e tipos de lesões:

54. Ulceradas.....| | | | |
 55. Pápulas| | | | |
 56. Nódulos| | | | |
 57. Vegetações| | | | |
 58. Verucosas.....| | | | |

Lesão principal:

59. Local maior lesão (marque apenas UM):

- 0 Cabeça 1 Face 2 Pescoço 3 Tronco 4 Braço D 5 Braço E
 6 Antebraço D 7 Antebraço E 8 Coxa D 9 Coxa E 10 Perna D 11 Perna E 12 Outro
 60. Se “Outro”, especificar: _____

4. N° do LTCP	3. N° do ILCF *	5. N° da Família
<u>Exame Físico Médico (Continuação)</u>		
Tamanho da maior lesão (mm):.....61a. x 61b.		
62. Tipo da lesão: 0 <input type="radio"/> ulcerada 1 <input type="radio"/> pápula 2 <input type="radio"/> nódulo 3 <input type="radio"/> vegetação 4 <input type="radio"/> verrucosa 5 <input type="radio"/> NE		
63. Infecção secundária:.....0 <input type="radio"/> não 1 <input type="radio"/> sim 2 <input type="radio"/> NE		
64. Cicatriz sugestiva de Leishmaniose cutânea:.....0 <input type="radio"/> não 1 <input type="radio"/> sim 2 <input type="radio"/> NE		
65. N° de cicatrizes:.....		
66. Tempo de duração das cicatrizes (anos):.....		
<u>Linfadenopatia:</u>		
67. Linfadenopatia presente:.....0 <input type="radio"/> não 1 <input type="radio"/> sim 2 <input type="radio"/> NE		
68. Mais de 1 cadeia envolvida:.....0 <input type="radio"/> não 1 <input type="radio"/> sim		
69. Local: 0 <input type="radio"/> Cervical 1 <input type="radio"/> Ocipital 2 <input type="radio"/> Axilar 3 <input type="radio"/> Inguinal 4 <input type="radio"/> Crural 5 <input type="radio"/> Outra		
Tamanho do maior linfonodo (mm):.....70a. x 70b.		
71. Foto das lesões realizada:.....0 <input type="radio"/> não 1 <input type="radio"/> sim		
<u>Triagem Otorrinolaringológica</u>		
204. Lesões mucosas ativas:.....0 <input type="radio"/> não 1 <input type="radio"/> sim 2 <input type="radio"/> NE		
205. Cicatriz característica de lesão mucosa:.....0 <input type="radio"/> não 1 <input type="radio"/> sim 2 <input type="radio"/> NE		
206. Referido ao PSCP para exame ORL:.....0 <input type="radio"/> não 1 <input type="radio"/> sim		
<u>Coleta e Exames Realizados</u>		
190. Colhido sangue para genética:.....0 <input type="radio"/> não 1 <input type="radio"/> sim		
46. Realizada IDRМ prévia*:.....0 <input type="radio"/> não 1 <input type="radio"/> sim 2 <input type="radio"/> NE		
47. Se “sim”:.....0 <input type="radio"/> POS 1 <input type="radio"/> NEG 2 <input type="radio"/> Duvidoso		
48. Se “não”, realizado agora*:.....0 <input type="radio"/> não 1 <input type="radio"/> sim		
.....Iniciais do entrevistador _____		
<u>Leitura da IDRМ:</u>		
IDRМ:.....49a. x 49b. mm		
50. IDRМ:.....0 <input type="radio"/> POS 1 <input type="radio"/> NEG 2 <input type="radio"/> Duvidoso		
<u>Diagnóstico da Forma Clínica de Leishmaniose - Fenótipo</u>		
207. Fenótipo da Forma Clínica:		
0 <input type="radio"/> Cutânea (CL=0)..... 1 <input type="radio"/> Mucosa (ML=1)..... 2 <input type="radio"/> Disseminada (DL=2)		
3 <input type="radio"/> Cutâneo mucosa (MCL=3)..... 4 <input type="radio"/> Pré-ulcerativa (4)..... 5 <input type="radio"/> Sub-clínica (5)		
6 <input type="radio"/> Sem evidência de LT		
Iniciais do investigador _____		

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA O ESTUDO DE INCIDÊNCIA DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM FAMILIARES DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NESTES INDIVÍDUOS

Nome do Projeto: Incidência de leishmaniose cutânea em familiares de pacientes com leishmaniose e avaliação da resposta imune nestes indivíduos

Nome do Paciente: _____

Nº do Projeto: _____

Investigador Principal: Edgar M. Carvalho, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira: Rua Augusto Viana, s/n, Canela – Hospital Universitário Professor Edgard Santos, 1º andar, 40110-160, Salvador-Bahia-Brasil.

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo que tem como objetivo determinar a ocorrência de leishmaniose entre pacientes que tem leishmaniose cutânea. Além disso, estudaremos todos os membros de sua família para verificar se existe alguma predisposição para o desenvolvimento desta doença. Após lhe ser explicado o que contém neste questionário você pode perguntar tudo sobre o estudo a seu médico. Familiares dos pacientes com leishmaniose cutânea diagnosticados no posto de saúde de Corte de Pedra serão convidadas a participar do estudo. Caso decida participar do estudo você será solicitado a assinar este formulário de consentimento. Aproximadamente 120 pessoas participarão deste estudo.

Participação voluntária:

Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar ou desistir de participar do estudo, não afetará de modo algum qualquer tratamento que você pode estar recebendo no posto de saúde de Corte de Pedra.

Finalidade do estudo: Este estudo visa determinar a incidência (aparecimento de casos de uma determinada doença) da leishmaniose entre familiares de pacientes com leishmaniose cutânea. Além disto, nós estudaremos se a sua resposta imune contra a leishmaniose tem relação com o aparecimento ou não de leishmaniose.

Procedimentos: Caso você aceite participar do estudo um questionário será feito para saber onde você mora, sua ocupação, seus hábitos e se você já teve leishmaniose. Um médico examinará você para ver se existe qualquer lesão que indique se você tem ou já teve leishmaniose. Também com o auxílio de uma lanterna e de um espéculo nós examinaremos você para ver se tem evidência de leishmaniose no nariz ou na boca. Caso seja detectada lesão ativa na pele ou na mucosa, você será convidado a comparecer no posto de saúde de Corte de Pedra para realizar exames de rotina para o diagnóstico da doença, como exame de sangue (sorológico) e teste cutâneo onde vamos observar se você já teve contato ou não com a leishmania. Se você concordar em retirar sangue para realização dos estudos, 20 ml de sangue serão colhidos (equivalente a um pouco mais que 1 colher de sopa) por um profissional capacitado, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada, com outros membros da equipe médica. Do Comitê de Ética do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, o Órgão de Proteção dos Direitos Humanos e o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados meios que possam identificar os participantes. Suas fichas clínicas e resultados de seus exames poderão ser também vistos pelo Institutional Review Board e o Office for Human Research Protection and the National Institute of Health of the United States of America.

Análise de riscos e benefícios: A retirada de sangue pode causar dor no local da punção com a agulha e raramente pode ocorrer sangramento ou formação de hematoma. O exame da sua pele, do seu nariz e da sua boca poderá documentar que você tenha leishmaniose cutânea ou leishmaniose mucosa. Neste caso você será tratado com antimônio (glucantime) o que trará vantagem para você desde que a doença foi documentada na sua fase ainda inicial. Este tratamento será acompanhado no Posto de Saúde de

Corte de Pedra e caso haja necessidade, ou pela realização de exames, ou complicações do tratamento, você será internado no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos em Salvador. A passagem para Salvador será custeada pela pesquisa, contudo a vaga para internamento será de acordo com as normas do Hospital, sendo às vezes necessário esperar alguns dias para consegui-la.

Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade: O diagnóstico precoce da leishmaniose poderá ser feito através do exame. Desde quando toda a família vai ser examinada, se houver algum caso de outra doença na família, uma orientação ou tratamento adequado vai ser oferecido. O melhor conhecimento sobre a leishmaniose poderá contribuir no futuro para medidas de controle da doença.

Custos: Você não terá custos com a participação no estudo e caso necessite de tratamento para leishmaniose a medicação lhe será fornecida gratuitamente. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Edgar M. Carvalho, Dra. Sara Passos e Dr. Luiz Henrique Guimarães, responsáveis por este estudo (Tel.: 71-3237-7353 ou 71-3339-6234). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética da Maternidade Climério de Oliveira, cujo endereço consta no início deste consentimento.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue. Favor assinalar um dos quadros abaixo para indicar se deseja ou não ter as suas amostras de sangue armazenado para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

ACEITO que amostras de meu sangue sejam armazenadas, para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

Não **ACEITO** que amostras de meu sangue sejam armazenadas, para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

Assinatura ou impressão digital do participante Data Hora

Nome/Assinatura do pesquisador Data Hora

Nome/Assinatura da testemunha Data Hora

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA MENORES DE IDADE (MENORES DE 18), PARA O ESTUDO DE INCIDÊNCIA DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM FAMILIARES DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NESTES INDIVÍDUOS

Projeto: Incidência de leishmaniose cutânea em familiares de pacientes com leishmaniose e avaliação da resposta imune nestes indivíduos

Nome do paciente: _____

Número de identificação no Projeto:

Principal Investigador: Edgar M.Carvalho, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brasil.

Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira: Rua Augusto Viana, s/n, Canela – Hospital Universitário Professor Edgard Santos, 1º andar, 40110-160, Salvador-Bahia-Brasil.

Convite e objetivo: Você está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa. O propósito deste estudo é determinar se você ou as pessoas que vivem na sua vizinhança tem maior chance de adquirirem a leishmaniose. Nós queremos entender como funciona a defesa do seu organismo e a de seus pais contra a leishmaniose. Nós também queremos saber se as atividades que você realiza no seu dia a dia oferecem algum risco para você ter ou não leishmaniose.

Nós perguntaremos a seus pais sobre sua saúde. Um médico fará exame físico em você, incluindo boca e nariz. Isto não causará dor em você. Então, nós tiraremos sangue (um pouco mais que a quantidade de uma colher de sopa) de seu braço usando uma seringa e agulha. Algumas vezes nós faremos um teste na pele, onde nós injetaremos uma pequena quantidade de líquido (duas gotas) no seu braço usando uma agulha fina. Se após a coleta de sangue ocorrer algum sangramento ou ficar roxo no local, um profissional ensinará a você como cuidar do local. Nós esperamos que este estudo nos esclareça porque você e sua família têm leishmaniose, então poderemos prevenir isto no futuro.

Você pode não participar deste estudo. Se você quer nos ajudar, por favor, assine ou coloque sua impressão digital abaixo.

_____ Data _____ hora _____
Assinatura ou impressão digital do paciente

_____ Data _____ hora _____
Assinatura ou impressão digital do responsável

_____ Data _____ hora _____
Testemunha

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo ou seu representante legal. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

_____ Data _____ hora _____
Investigador

ANEXO 3. OFÍCIO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) DO HUPES, APROVANDO A INVESTIGAÇÃO



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
IORG0003460. Assurance FWA00002471, October 26, 2010
IRB00004123, October 5, 2007 - October 4, 2010

Rua Augusto Viana, s/n, Canela – Hospital Universitário Professor Edgard Santos, 1.º andar
 Cep: 40.110-160 – Salvador-Bahia telefax: (71) 3283-8043 e-mail: cepmco@ufba.br homepage www.cepico.ufba.br

PARECER/RESOLUÇÃO ADITIVA N.º 240/2009

Para análise e deliberação deste Institucional o Professor, Doutor, **Edgar Marcelino de Carvalho**, Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa “**Incidência de leishmaniose cutânea em familiares de pacientes com leishmaniose e avaliação da resposta imune nestes indivíduos**”, posto sob pendência em 16 de Setembro de 2009 pelo Parecer/Resolução N.º 087/2009 deste Colegiado, apresentou, em 13 de Outubro de 2009, as adequações aos “**critérios de inclusão e exclusão**” propostos no Estudo, o “**CRF**” atualizado, datado de 19 de Junho de 2009, bem como anexou o novo “**Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido**” em atendimento ao referido Parecer. ✓

Inexistindo nas proposições analisadas conflito administrativo, processual e ético que contra-indiquem a execução da Pesquisa, ficam as mesmas **aprovadas**. ✓

APROVADO

Salvador, 30 de Outubro de 2009


 Professor, Doutor, Antônio dos Santos Barata,
 Coordenador – CEP/MCO/UFBA

Observações importantes. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste (a) ao (à) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução e nas “Recomendações Adicionais” apensas, **bem como a impostergável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação**, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).

ANEXO 4. NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA The Journal Of Infectious Diseases (JID)

29/07/2016

Oxford Journals | Medicine & Health | The Journal of Infectious Diseases | Manuscript Format

[Oxford Journals](#) [Medicine & Health](#) [The Journal of Infectious Diseases](#) [For Authors](#) [Manuscript Format](#)

Manuscript Format

Please note that the journal now encourages authors to complete their copyright license to publish form online

Submission

Please read these instructions carefully and follow them closely to ensure that the review and publication of your paper is as efficient and quick as possible. The Editors reserve the right to return manuscripts that are not in accordance with these instructions.

All material to be considered for publication in *The Journal of Infectious Diseases (JID)* should be submitted in electronic form via the journal's online submission system. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, instructions on how to submit your manuscript online can be found by clicking [here](#).

Note: PDF only submissions are not accepted, manuscripts should be in Microsoft Word, LaTeX, WordPerfect or Rich Text Format.

MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

Your manuscript will be returned if you do not do the following:

1. Specify the type of article and adhere to the following limits:

- Major Article: 3500 words, 50 references, 7 inserts (tables and figures, with no more than 4 panels per figure) in print, and no more than 25 MB of online-only supplementary data.
- Brief Report: 2000 words, 15 references, 2 inserts (with no more than 4 panels per figure) in print, and no more than 25 MB of online-only supplementary data.

2. Include a cover letter with the following information:

- A statement that the manuscript has not been submitted or accepted elsewhere
- A statement that all authors fulfill the criteria given in the Authorship paragraph (see below)
- A statement indicating whether any writing assistance other than copy editing was provided in the preparation of the manuscript
- A list of 5 potential reviewers, with their e-mail addresses, and a brief description for each of his/her qualifications as a reviewer

3. All file names—for manuscript, cover letter, figures, tables—should contain no spaces between numbers or letters. File names may be run together (e.g., authornamearticletitleversion1) or contain punctuation such as underscores, hyphens, or both (e.g., author-name-article-title-version-1 or author_name_article_title_version_1).

4. Ensure that the references are appropriately formatted in *JID* style

5. Ensure that all text, including tables and references, is double spaced

6. Ensure that the manuscript has page numbers

7. Use a title of no more than 160 characters and spaces and a running title of no more than 40 characters and spaces

8. Include the word count of the abstract and of the text

- We require that all submissions use line-numbering within the text.

9. Include a footnote page with the following items:

- A conflict of interest statement
- A funding statement
- Mention of any meeting(s) where the information has previously been presented
- Corresponding author contact information

10. Include 3–10 key words at the end of the abstract

11. Include, in the Methods section, a statement regarding informed consent and human and/or animal experimentation guidelines, when indicated

12. Include the registry number for a report of a clinical trial

13. Provide written permission for all personal communications

14. Provide accession numbers for nucleotide sequences

15. Use only approved human genetic nomenclature and notation (see the relevant subsections of the "Manuscript Preparation" section, below)

16. Submit newly identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) to the appropriate database; include previously recognized or recently submitted SNP numbers

JID complies with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (for the complete text, see <http://www.icmje.org>), except that reference citations should appear in the text in square brackets (not parentheses). Text, tables, references, and legends must be double spaced. Italics should be used for genus and species names and for genes, but not for *in vivo*, *in vitro*, *in situ*, et al., or other Latin-derived expressions listed in Webster's Collegiate Dictionary; see a recent issue of *JID* for appropriate style.

All manuscripts—Major Articles, Brief Reports, Correspondence, Perspectives, Editorials, Reviews, and Supplement Articles—must have conflict of interest and funding statements (see the below sections for further details).

Major Articles describe original investigations that are an important advance in the field and that have been brought to an acceptable degree of completion. Major Articles must be no longer than 3500 words of text (from the beginning of the introduction to the end of the discussion; do not count the abstract or the references), and illustrations must be limited to the minimum necessary for clear and concise presentation. For Major Articles describing results of clinical trials (see "Clinical trials registration," below), the abstract must be structured with the headings Background, Methods, Results, and Conclusions and must be no more than 200 words; for other Major Article manuscripts, the abstract may be structured (200-word limit) or unstructured (150-word limit). The order of the text should be Background, Methods, Results, and Discussion. The methods section in the main article should be sufficiently detailed to allow readers to repeat the study without having to refer to supplementary material. Major Articles are limited to a maximum of 7 inserts (tables and figures combined, with no more than 4 panels allowed per figure) in print, 50 references, and no more than 25 MB of online-only supplementary data.

Brief Reports present complete studies that are narrower in scope than those described in Major Articles or that represent new developments. Manuscripts that are descriptive or primarily methodologic in nature, that report results of phase I and II vaccine trials (see "Clinical trials registration," below), or that describe *in vitro* chemotherapeutic studies should, in general, be submitted as Brief Reports. Brief Reports include an abstract (no more than 100 words) and are limited to no more than 2000 words of text, a total of 2 inserts (tables or figures) in print, 15 references, and no more than 25 MB of online-only supplementary data. The order of the text should be Background, Methods, Results, and Discussion. The methods section in the main article should be sufficiently detailed to allow readers to repeat the study without having to refer to supplementary material.

THE JOURNAL

[About the Journal](#)
[Dispatch date of next issue](#)
[IDSA Journals app](#)
[Mobile website](#)
[Journals Career Network](#)

Published on behalf of

Infectious Diseases Society of America



HIV Medicine Association



Society Members: For your free access to this journal, log in via the IDSA members area.

Impact Factor: 6.344

5-Yr impact factor: 5.888

Editor-in-Chief

Martin Hirsch, M.D.

[View full editorial board](#)

[Contact the Editorial Office](#)

[IDSA Conflict of Interest policy](#)

ARCHIVAL MATERIAL

[Browse the archive](#)
[Supplement archive](#)
[Cover archive](#)
[Free Editor's Choice Collection](#)

FOR AUTHORS

[Instructions for Authors](#)
[ICMJE Form](#)
[Submit Now!](#)
[OUP Services for Authors](#)
[Rights & Permissions](#)
[Self-archiving policy](#)



FOR REVIEWERS

[CME Information](#)

Correspondence (letters) must be submitted in reference to a previous publication in *JID* (within the preceding 12 months); otherwise they will not be considered. Please prepare the letter in manuscript format, including a title page. The letter cannot exceed 750 words of text, 1 insert (table or figure), and 10 references.

Editorials are invited by the Editor and are overviews or critiques of articles appearing in *JID*.

Perspectives are brief (<1500 words, limit 2 inserts, 25 references) individual viewpoints on controversial topics in infectious diseases. Unsolicited perspectives are considered, and authors should contact the Editor in advance of submission to determine whether the topic is deemed appropriate.

Reviews that are research oriented will be considered. They should be no longer than 3500 words (from the beginning of the introduction to the end of the discussion) and have no more than 7 inserts (tables and figures combined, with no more than 4 panels per figure) in print, 50 references, and no more than 25 MB of online-only supplementary data. Authors should contact the Editor in advance of submission to determine whether a specific topic is deemed appropriate and timely.

Tables and Figures

Major Articles are limited to a maximum of 7 inserts (tables and figures combined, with no more than 4 panels allowed per figure) in print and no more than 25 MB of online-only supplementary data. Brief Reports are limited to a maximum of 2 inserts in print and no more than 25 MB of online-only supplementary data. A single insert should not contain both tables and figures.

Data should not be repeated in both a table and a figure. Abbreviations and acronyms used in tables and figures must be explained in the table footnotes and figure legends, respectively, even if they were already defined in the text.

Tables

Tables should be numbered in the order of mention in the text. Tables should be typed double spaced throughout, with no vertical or internal rules. Footnotes and accompanying explanatory material should be kept to a minimum. Footnotes should be placed below the table and designated by superscript lowercase letters (listed in order of location when the table is read horizontally). Each column must have an appropriate heading describing the data in the column below, and units of measure must be clearly indicated. For further instructions on the preparation of tables in Word or WordPerfect, consult the [Guidelines for Tables](#).

Figures and Illustrations

Figures should be clear and comprehensible, and should generally contain one panel. No more than four panels are allowed per figure. Each figure should have a resolution of at least 300 DPI, and should be provided, individually, in its native file format, i.e., the file type in which the image was created.

Image files should not be manipulated in any way, because this manipulation could lead to misinterpretation of the information present in the original image. Inappropriate manipulation may include, but is not limited to: movement, introduction, removal or enhancement of specific features, changes in brightness, contrast, or color balance that obscure, eliminate, or misrepresent any information. Digital images may be scrutinized by the editors for possible improper manipulation. If evidence is found of inappropriate manipulation, we reserve the right to ask for original data and, if that is not satisfactory, the manuscript may be rejected and the authors' institutions notified.

Patient identity must be removed in all figures (i.e., x-rays, MRIs, charts, photographs, etc.). Written informed consent is required from any potentially identifiable patient or legal representative, and should be presented in either the Methods section or the Acknowledgments.

For further information regarding figures, please click [here](#).

All figures submitted to the journal in color will be published in color online at no cost. Figures in the print version of your article may appear in color or grayscale. Authors who choose to publish their figures in color in the print journal will be invoiced for **\$500 for the first page of color and \$400 for each additional page of color**; you will be asked to approve this cost when you submit your article online. You will be issued an invoice at the time of publication. If you opt for color online but grayscale in print, please ensure that the figure legend provides an accurate description of both the grayscale and color versions of the figure. (e.g., a graph's green and red lines may turn out to be an identical shade of gray in grayscale.) A possible remedy would be to use a solid line in place of one colored line and dashes in place of the other. You will have a chance to look at the grayscale version of your figures in the proof stage.

Color Illustrations

Authors are required to pay the full cost of reproduction of color figures. For details see [Journal Charges](#).

Supplementary Data

Authors may submit supplementary material for online-only publication if it is important and directly relevant to the understanding or interpretation of the main article. Such information might include more detailed methods, extended data sets/data analysis, or additional figures. All supplementary text and figures must be provided in suitable electronic formats, with each of the following as a separate file: text, each table, each figure with its own legend, each video. Do not submit any supplementary materials within the main manuscript document. All material to be considered as online-only supplementary data must be submitted at the same time as the main manuscript for peer review. It cannot be altered or replaced after the manuscript has been accepted for publication, and it will not be copyedited or typeset. Please indicate clearly all material intended as supplementary data upon submission and name the files (e.g., "Supplementary Figure 1," "Supplementary Data," etc.). Also ensure that the supplementary data are referred to in the main manuscript where necessary, for example as "(see Supplementary data)" or "(see Supplementary Figure 1)." The amount of supplementary material must be justified, and limited to no more than 25 MB. If the material is deemed appropriate by the editors, it will be posted online at the time the article is published. Since the supplementary material will not be edited, authors are responsible for its accuracy.

Supplements

Supplements are published by *JID*. Requirements for supplement manuscripts follow those for *JID* manuscripts (e.g., cover letter, conflict of interest, and funding statements). Inquiries related to suitability of topic, program organization, and production should be made in writing to the Editor.

Cover Letter

All manuscripts submitted to *JID* must be accompanied by a letter declaring that the manuscript has not been submitted or accepted for publication elsewhere. This letter must warrant that all authors have seen and approved the content and have contributed significantly to the work. Authors should suggest five potential unbiased reviewers who are qualified to review their manuscript. A cover letter must also accompany a revised submission and must address, point by point, issues raised in the review process.

Related Manuscripts

If there appears to be significant overlap between another manuscript submitted to *JID* and another manuscript submitted to *JID* or another journal by the same authors or if there is an overlap between a manuscript submitted to *JID* and one published by *JID* or another journal, the editors will ask the corresponding author to respond to the question of overlap. On the basis of the response, the editors may choose to consider the manuscript further, ask for modification of the manuscript, or reject the manuscript; in the case of a rejected manuscript, the editors will provide the author(s) with a detailed explanation. The editors may also choose to take further action, which could include contacting the appropriate superior at the home institution and/or suspending publishing privileges in *JID* for a designated period of time. If it is found that the authors of an article published in *JID* had published an overlapping or identical manuscript in another journal, the editors will publish an announcement to that effect in *JID*.

Title Page

The title should be short, specific, and informative. The first name, initial(s), and surname of each author should be followed by his or her department, institution, city with postal code, and country. The fax, telephone number, and e-mail address of the corresponding author should also be provided. It is editorial policy to list only one author for correspondence. Any changes of address may be given next to the affiliations or acknowledgments. On the title page, please supply a running head of not more than 40 characters and spaces, a title of not more than 160 characters and spaces, the names and affiliations of all of the authors, and word counts of the abstract and the text. Each author's full name must be used. If there is potential confusion with respect to whether the first name presented is actually the last name of the author, please identify the last name.

Footnote Page

Footnotes must include (1) a statement that the authors either have or do not have a commercial or other association that might pose a conflict of interest (e.g., pharmaceutical stock ownership, consultancy, advisory board membership, relevant patents, or research funding); (2) a statement naming sources of financial support (including grant numbers); (3) the name, date (month and year), and location (city, state, and, if not USA, country) of a meeting at which all or part of the information has been presented (include an abstract number if possible); (4) the name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the person to whom correspondence and requests for reprints should be addressed; and (5) current affiliations and addresses for authors whose affiliations have changed since completion of the study.

Abstract

The abstract for a Major Article describing results of a clinical trial must be no more than 200 words and must be structured with the headings *Background, Methods, Results, and Conclusions*. The trial must be registered (see "Clinical trials registration"), and the abstract must include the registry's URL and the trial's registration number. Abstracts of other Major Articles may be structured (200-word limit) or unstructured (150-word limit). Abstracts of Brief Reports should be no more than 100 words. Whether structured or unstructured, the abstract must state the purpose of the research, the methods used, the results, and the conclusions. Do not cite references in the abstract.

Conflict of Interest disclosure form

Looking for your next opportunity?

[IDSA Call for Applications Clinical Practice Guidelines Editor](#)
Arlington, Virginia

[Cancer Epidemiology Faculty - Section Chief](#)
San Antonio, Texas

[Plastic Surgeon](#)
Kalamazoo, Michigan

[IDSA Call for Applications Clinical Practice Guidelines Editor](#)
Arlington, Virginia [View All Jobs](#)

Journals Career Network

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

FOR THE MEDIA

[Press Room](#)

ALERTING SERVICES

[Email table of contents](#)

[CiteTrack](#)

[XML RSS feed](#)

Include 3-10 key words, separate from the abstract. Authors are reminded that the abstract is of particular value to producers and users of online literature retrieval systems such as MEDLINE.

Text

The text of Major Articles must be no longer than 3500 words, and that of Brief Reports no longer than 2000 words. The Methods section must include a statement that informed consent was obtained from patients or their parents or guardians and that human experimentation guidelines of the United States Department of Health and Human Services and/or those of the authors' institution(s) were followed in the conduct of clinical research, or that animal experimentation guidelines were followed in animal studies.

Products

For commercially obtained products mentioned in the text, list full names of manufacturers. Generic names of drugs and other chemical compounds should be used.

Abbreviations

Non-standard abbreviations should be defined at the first occurrence and introduced only where multiple use is made. Authors should not use abbreviations in headings. Abbreviations do not need to be defined, even at first mention, if they are the standard abbreviations within AMA 10th edition (see pages 502-525).

Statistical Analysis

The statistical analyses used should be identified both in the text and in all tables and figures where the results of statistical comparison are shown.

Units of Measure

All data should be expressed in metric units; use of SI units is encouraged. Use °C for temperature.

Funding

Details of all funding sources for the work presented should be given in a separate section entitled "Funding." This information should appear before the "Acknowledgment" section. The following rules should be followed:

- The sentence should begin: "This work was supported by ..."
- The full official funding agency name should be given, i.e., "the National Cancer Institute at the National Institutes of Health" or simply "National Institutes of Health" not "NCI" (one of the 27 substations) or "NCI at NIH." [Please go to this Web site for a full RIN-approved list of UK funding agencies.](#)
- Grant numbers should be complete and accurate and provided in brackets as follows: "[grant number ABX CDXXXXXX]"
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: "[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]"
- Agencies should be separated by a semicolon (plus "and" before the last funding agency)
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number "to [author initials]."

An example is given here: "This work was supported by the National Institutes of Health [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.] and the Alcohol & Education Research Council [HFY GR667789]."

Crossref Funding Data Registry

In order to meet your funding requirements authors are required to name their funding sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about the CHORUS initiative please click [here](#).

Acknowledgments

Acknowledgments and details of non-financial support must be included at the end of the text before references and not in footnotes. Personal Acknowledgment should precede those of institutions or agencies. Please note that acknowledgment of funding bodies and declarations regarding conflict of interest should be given in separate "Funding" and "Conflict of Interests" sections, respectively.

Conflict of Interests

Further guidance on Conflict of Interests is available [here](#).

References

Full references should be provided in accordance with the style of *JID*.

EndNote and Reference Manager are software programs for publishing and managing references/bibliographies, and are available from Thomson Reuters. If you use EndNote or Reference Manager to facilitate referencing citations, this journal's style is available for use. Information on purchasing and downloading EndNote can be found here: <http://endnote.com/downloads>. Additional relevant information can be found here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>. For technical support, see <http://www.endnote.com/contact/customer-support>.

Major Articles are limited to 50 references, and Brief Reports are limited to 15 references. Only works that have been published or accepted for publication can be included in the reference list. Unpublished observations by the authors (authors' unpublished data), personal communications (J. L. Searle, personal communication), and manuscripts submitted for publication (H. Chapin and G. Miller, submitted) should be mentioned parenthetically in the text. Please note that all personal communication must be confirmed in writing by the person mentioned. Please number references in order of appearance; those cited only or first in tables or figures are numbered according to the order in which the table or figure is cited in the text. Example: If table 2 is cited in the text after reference 25, a new reference cited in table 2 will be reference 26.

References must follow the National Library of Medicine format as used in [MEDLINE](#) and [Uniform Requirements](#). Provide all authors' (or editors') names when there are fewer than 7; for 7 or more, list the first 3 and add "et al." Titles of journals not listed in MEDLINE should be spelled out in full. Reference to a doctoral dissertation should include the author, title, institution, location, year, and publication information, if published. For online resources, include a URL and date accessed. Accuracy of references is the responsibility of the authors.

Examples of the proper format are as follows:

Journal Article

Uherova P, Connick E, MaWhinney S, Schlichtemeier R, Schooley RT, Kuritzkes DR. In vitro effect of interleukin-12 on antigen-specific lymphocyte proliferative responses from persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **1996**; 174:483-9.

Book chapter

McIntosh K. Diagnostic virology. In: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, et al., eds. *Fields virology*. 2nd ed. Vol 1. New York: Raven Press, **1990**:411-40.

Conference program

Lyon DJ, Cheng AFB, Norrby SR. Mechanisms of cefotaxime resistance in blood culture isolates of *Enterobacter* high prevalence of extended-spectrum β -lactamases [abstract C43]. In: Program and abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (San Francisco). Washington, DC: American Society for Microbiology, **1995**:47.

Internet site

Public Health Service Task Force. Recommendations for the use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-1 infected women for maternal health and interventions to reduce perinatal HIV-1 transmission in the United States. Available at: <http://www.hivatis.org>. Accessed 24 April 2002.

For further information about medical references, see the [PubMed Link Help Page](#).

PERMISSION TO REPRODUCE FIGURES AND EXTRACTS

Permission to reproduce copyright material, for print and online publication in perpetuity, must be cleared and if necessary paid for by the author; this requirement includes applications and payments to DACS, ARS, and similar licensing agencies where appropriate. Evidence in writing that such permissions have been secured from the rights-holder must be made available to the editors. It is also the author's responsibility to include Acknowledgment as stipulated by the particular institutions. Please note that obtaining copyright permission could take some time. Oxford Journals can offer information and documentation to assist authors in securing print and online permissions: please

see the Guidelines for Authors section at http://www.oxfordjournals.org/access_purchase/permissions.html. Should you require copies of this, please contact the editorial office of *JID* in question or the Oxford Journals Rights department.

For a copyright prose work, it is recommended that permission is obtained for the use of extracts longer than 400 words; a series of extracts totaling more than 800 words, of which any one extract is more than 300 words; or an extract or series of extracts comprising one-quarter of the work or more.

Note: If you will be selecting an Open Access license for your manuscript, request Open Access re-use permission. If you are unable to secure such re-use or that option is not available, please state this clearly by supplying the following credit line alongside the material:

Title of content

Author, Original publication, year of original publication, by permission of [rights holder]

This image/content is not covered by the terms of the Creative Commons licence of this publication. For permission to reuse, please contact the rights holder.

Written permission must be obtained from all investigators cited in a personal communication who are not coauthors of the present manuscript and from the copyright owner if a previously published table or figure is to be reproduced. Additionally, authors should include a copy of "in press" references and articles by the same authors on the same subject that were submitted elsewhere. All letters of permission and references/articles should be mailed to the *JID* editorial office at 65 Landsdowne St., #412, Cambridge, MA 02139.

JOURNAL COPYEDITING STYLE

Authors are referred to the *AMA Manual of Style: A Guide for Authors and Editors* (10th ed., Oxford University Press, 2007) and the *Chicago Manual of Style* (15th ed., University of Chicago Press, 2003).

Language editing, if your first language is not English, to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers is recommended, though optional. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. For further information on this service, please click [here](#). Several specialist language editing companies offer similar services and you can also use any of these. None of these services have been validated by *JID*, OUP or IDSA. Authors are liable for all costs associated with such services.

COPYRIGHT AND LICENSE

It is a condition of publication for all Oxford Journals that authors either assign copyright or grant an exclusive license to Oxford University Press or the sponsoring Society. This assignment ensures that all of the necessary rights needed for publication of the article are in place including provision for any requests from third parties to reproduce content from the journals are handled efficiently and consistently by OUP, enabling the content to be as widely disseminated as possible. No article will be published unless the license has been received in the system at Oxford Journals. Any queries about the license form should be sent as soon as possible to [Rights and Permissions](#) so that any issues can be resolved quickly and so any delay in publication is avoided.

As part of the terms of the license agreement, authors may use their own material in other publications written or edited by themselves provided that *JID* is acknowledged as the original place of publication and Oxford University Press as the publisher. As the author(s), copyright of the article remains yours (or your employer's if your employer claims copyright in your work). See [here](#) for full details of Oxford Journals' copyright policy and the rights retained by you/your institution under the terms of the license.

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals authors will be invited to complete an online copyright licence to publish form.

Work submitted for publication must be original, previously unpublished, and not under consideration for publication elsewhere. If previously published figures, tables, or parts of text are to be included, the copyright-holder's permission must have been obtained prior to submission. For more information on how to obtain permissions, please consult [Rights and Permissions](#).

PROOFS

Authors are sent page proofs by email. These proofs should be checked immediately and corrections, as well as answers to any queries, returned to the publishers as an annotated PDF via email or fax within 2 working days (further details are supplied with the proof). It is the author's responsibility to check proofs thoroughly.

OFFPRINTS

Authors will receive electronic access to their article free of charge. Printed offprints may be purchased in multiples of 50, using the Oxford Journals Author Services site

ADVANCE ACCESS

Advance Access articles are a mix of accepted manuscripts, labeled as "Uncorrected Proofs", and finalized manuscripts, labeled as "Corrected Proofs". Uncorrected Proofs have been accepted by the journal but have not been copyedited or formatted for publication. Copyediting may lead to minor differences between the Uncorrected Proof and the Corrected Proof; there will be changes to the formatting and there may also be differences in the quality of the graphics. More information, including how to cite Advance Access papers, can be found on the [Advance Access page](#). Appearance in Advance Access constitutes official publication, and the Advance Access version can be cited by a unique DOI (Digital Object Identifier). When an article appears in an issue, it is removed from the Advance Access page.

OPEN ACCESS OPTION

The Journal of Infectious Diseases authors have the option to publish their paper under the [Oxford Open](#) initiative; whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After your manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory license to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged the additional fee.

Oxford Open articles are published under Creative Commons licenses.

RCUK/Wellcome Trust funded authors publishing in *The Journal of Infectious Diseases* can use the Creative Commons Attribution license (CC-BY) for their articles.

All other authors can choose from the following Creative Commons license:

- Creative Commons Attribution Non-Commercial No Derivatives license (CC-BY-NC-ND)

Please click [here](#) for more information about the Creative Commons licenses.

You can pay Open Access charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or post. The applicable open access charges vary according to which Creative Commons license you select. The open access charges are as follows.

Charges for CC-BY
 • Regular charge: £2188/ \$3500/ €2844

Charges for CC-BY-NC-ND:
 • Regular charge: £1875/ \$3000/ €2438

Please note that these charges are in addition to any color charges that may apply.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.

ANEXO 5. CARTA DO EDITOR ACUSANDO ACEITAÇÃO DO ARTIGO.

OXFORD JOURNALS

Dear Author

I am pleased to inform you that Oxford Journals has published your article in Journal of Infectious Diseases.

Here are the free-access links to your online article:

Abstract:
<http://jid.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/jiw196?ijkey=vDERHQGXJ2zje8w&keytype=ref>

PDF:
<http://jid.oxfordjournals.org/cgi/reprint/jiw196?ijkey=vDERHQGXJ2zje8w&keytype=ref>

The full citation for your article is:

Immunological markers of protection in Leishmania (Viannia) braziliensis infection: A five years cohort study
 Aline C. Muniz; Olivia Bacellar; Ednaldo Lima Lago; Augusto M. Carvalho; Pedro P. Carneiro; Luiz Henrique Guimaraes; Paulo N. Rocha; Lucas P. Carvalho; Marshall Glesby; Edgar M. Carvalho
 Journal of Infectious Diseases 2016;
 doi: 10.1093/infdis/jiw196

This link will not change throughout the production process and will automatically connect you to the most recent version of your paper. You may use this link to access the various versions of your paper as they become available: the uncorrected, untypeset Advance Access version; the copyedited and typeset Advance Access version; and the final issue version. The final issue version will contain the volume, issue, and page number details. Prior to the final version, you may cite your paper using its doi citation (for more information on DOIs see

Gmail - Your article has been published in Journal of Infectious Diseases

<http://www.doi.org>). Please see below for additional information and the conditions of use for the links.

Thank you for publishing with Oxford Journals and I hope to be of service to you again soon.

Best wishes,
 Journal of Infectious Diseases Production Editor
 E-mail: jid@oup.com
 Visit Journal of Infectious Diseases Online



Additional information (please read)

Sending a free-access URL

There are several advantages to providing you with a free-access link to your article instead of a PDF file, including:

- Access to both the HTML and PDF versions of an article (where available).
- You (and your co-authors) plus any users of your own personal/institutional web sites will get free access to the finally published and authoritative version of the article that is available from our site whether or not they are a subscriber to the journal;
- We guarantee that you (and your co-authors) will have continued access to your article without the responsibility of maintaining and updating these files;
- All the linking and other functionality for the article remains in place;
- We can continue to gather accurate usage statistics for the journal to help us ensure that we continue to provide a good service for authors and readers.

Using the free-access URL

To access your article, click on the link above. If you reach a sign-in page, go back to this e-mail and check if there are extra letters or numbers on the line below the URL. If so, the URL has broken over two or more lines and does not get picked up in its entirety by your browser when clicking through. In this case, copy and paste each line into the address bar of your internet browser, deleting extra characters (such as < or >) or spaces. This should allow the URL to bypass subscriber sign-in.

Distribution of the link

You may wish to include these links in your list of publications. As with an offprint, following these links allows interested readers free access to the full text of your paper whether or not they are a subscriber to the journal. However, in distributing the link, we request that you consider the following points:

- The article should only be viewed from the Oxford Journals site, and not hosted by your own personal/institutional web site or that of other third parties, though you or your co-authors may post the URLs on your own sites or those of your institutions/organizations;
- Single copies of the article can be printed and distributed to interested colleagues who wish to use the article for personal research/study purposes only. For those wishing to make commercial use of the article, please direct them to journals.permissions@oup.com for permissions information or see the [website](#).

Advance Access articles

Gmail - Your article has been published in Journal of Infectious Diseases

Please note that the URLs given here are for the Advance Access version of your paper. Once the article appears in a paginated issue the link will automatically take you to the latest version. To be alerted when the page numbers are available, please register for our electronic table of contents (eTOC) [alerting service](#).



OXFORD JOURNALS
OXFORD UNIVERSITY PRESS

Information for authors