



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DETERMINANTES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE CELULAR
HUMANA À INFECÇÃO POR *LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI*.**

Hênio Godeiro Lacerda

Natal/RN

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DETERMINANTES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE CELULAR
HUMANA À INFECÇÃO POR *LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI*.**

Autor:
Hênio Godeiro Lacerda

Tese de Doutorado apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Natal/RN

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE

L131d

Lacerda, Hênio Godeiro.

Determinantes envolvidos na resposta imune celular humana à infecção por *Leishmania infantum chagasi* / Hênio Godeiro Lacerda.- Natal, 2012.

169f. :il.

Orientadora: Prof^a Dr^a Selma Maria Bezerra Jerônimo.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Leishmaniose Visceral – Tese. 2. Imunidade protetora – Tese. 3. Hipersensibilidade Tardia – Tese. I. Jerônimo, Selma Maria Bezerra. II Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 616.993.161 (043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DETERMINANTES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE CELULAR
HUMANA À INFECÇÃO POR *LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI*.**

Prof^a Dra. Técia Maria de Oliveira Maranhão

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Natal/RN

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DETERMINANTES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE CELULAR
HUMANA À INFECÇÃO POR *LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI*.

Esta tese foi julgada adequada à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde e aprovada, em sua forma final, pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Membros:

Presidente – Prof^a Dra. SELMA MARIA BEZERRA JERONIMO - UFRN

Externo ao Programa - Prof^a Dra. IARA MARQUES DE MEDEIROS - UFRN

Externo ao Programa - Prof^a Dra. LARA DE MELO BARBOSA – UFRN

Externo à Instituição - Prof^a Dra. ALDA MARIA DA CRUZ - FIOCRUZ - RJ

Externo à Instituição - Prof Dr. ANASTACIO DE QUEIROZ SOUSA - UFC

Dedico esta tese

a minha mãe,

Zélia Godeiro Lacerda, que tenho certeza, está iluminando-me em minha caminhada, pelas orações que fez para que eu pudesse alcançar mais esta vitória; e ao meu pai, Francisco de Assis Barros de Lacerda, pelo ensinamento de que não há glória sem sacrifício.

AGRADECIMENTOS

- À professora Selma Maria Bezerra Jerônimo, pelas orientações neste trabalho e pelo exemplo de simplicidade que pude observar nesses 13 anos de convivência harmoniosa com projetos sobre doenças negligenciadas;
- Ao Sr. Manoel Fernandes, agente de endemias da Fundação Nacional de Saúde, pela imprescindível colaboração no trabalho de campo e pela aprazível convivência, tornando as nossas árduas jornadas em momentos de júbilo;
- A Bruna Lima Maciel, pelas orientações nas avaliações nutricionais e pela ajuda a mantermos o bom humor em nossas idas a campo que, com certeza, se tornaram mais alegres com sua presença;
- A Paula Viviane, veterinária do nosso trabalho, pelo prazer de desfrutar da sua companhia meiga e serena e por tolerar os momentos de “doidice” que tive;
- A Núbia Natalir, pelas imensuráveis ajudas na realização das sorologias e no trabalho de campo que, na sua companhia, se tornaram históricas e ficaram registradas nos anais do laboratório de Imunogenética;
- A Iraci Duarte, pelo fornecimento dos dados de notificações da Secretaria do Estado de Saúde e pela amizade que construímos durante os últimos anos;
- A todos que participaram do nosso estudo, pelo carinho com que acolheram nossa equipe e por se prontificarem a colaborar para que sejamos o instrumento de uma ciência que busca uma vida melhor para todos no futuro.

- A todos os amigos do Laboratório de Imunogenética da UFRN, pela amizade e carinho que demonstram a mim;
- A todos os colegas de trabalho do Departamento de Infectologia da UFRN, pelas ausências de algumas atividades, para que pudéssemos finalizar essa grata missão;
- Ao meu filho Heitor e a minha esposa Karinna, pela compreensão e carinho, durante minhas ausências ocorridas nesta jornada;
- A todos os amigos e familiares que, com muito amor, torceram para que eu subisse mais este degrau na vida;
- Por fim, a todos apresento meus mais sinceros agradecimentos, na certeza que nossos sonhos renascerão na perseverança e na obstinação pelas causas nobres.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------|
| LISTA DAS FIGURAS, TABELAS E QUADROS | xii |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | xvi |
| RESUMO | xviii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Objetivos | 4 |
| 1.2 Objetivo geral | 4 |
| 1.1 Objetivos específicos | 4 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 5 |
| 2.1 Histórico | 5 |
| 2.2 Características da leishmaniose visceral | 8 |
| 2.3 Epidemiologia | 8 |
| 2.4 Agente etiológico, reservatórios e transmissão vetorial da leishmânia | 18 |
| 2.5 Imunologia | 23 |
| 2.6 Quadro clínico | 31 |
| 2.7 Diagnóstico | 33 |
| 2.8 Intradermorreação de Montenegro | 37 |
| 3. MÉTODOS | 41 |
| 3.1 Desenho do estudo | 41 |
| 3.2 Local do estudo | 41 |

| | |
|--|----|
| 3.3 População estudada | 42 |
| 3.3.1 Identificação dos indivíduos da coorte | 42 |
| 3.3.1.1 Critérios de inclusão | 42 |
| 3.3.1.2 Critérios de exclusão | 42 |
| 3.3.2 Identificação dos indivíduos do estudo caso controle aninhado | 42 |
| 3.4. Coleta de dados epidemiológicos e amostra sanguínea da coorte | 43 |
| 3.5 Amostra sanguínea para avaliação imune do estudo caso-controle | 45 |
| 3.6. Definição de infecção por leishmânia | 45 |
| 3.6.1. Diagnóstico de infecção por leishmânia utilizando extrato solúvel de antígenos, obtidos de promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> (SLA) | 45 |
| 3.6.2. Diagnóstico de infecção por leishmânia utilizando o teste de hipersensibilidade tardia-DTH (teste de Montenegro) | 47 |
| 3.7. Determinação de citocinas e quimiocinas | 48 |
| 3.8. Análises clínicas e sorológicas caninas para detecção de potenciais reservatórios de leishmânias | 50 |
| 3.9. Armazenamento dos dados | 51 |
| 3.10. Análise dos dados e tamanho de amostra | 51 |
| 3.11. Considerações éticas | 57 |
| 4. RESULTADOS | 59 |
| 4.1. Características demográficas da população estudada | 59 |
| 4.2. Frequência dos possíveis fatores influenciadores da resposta imune celular nos indivíduos pesquisados | 60 |
| 4.3. Frequência dos fatores epidemiológicos analisados nos indivíduos pesquisados | 62 |
| 4.4. Avaliação nutricional dos pesquisados | 65 |

| | |
|--|------------|
| 4.5. Marcadores de infecção por leishmânia e mensuração de DTH | 68 |
| 4.6. Análises de correlação entre resposta ao teste de Montenegro e níveis de anticorpos nos indivíduos com passado de LV quanto ao tempo pós-tratamento | 74 |
| 4.7. Análises univariadas entre fatores epidemiológicos e resposta DTH na visita de seguimento | 75 |
| 4.7.1. Fatores demográficos | 75 |
| 4.7.2. Sintomas clínicos | 76 |
| 4.7.3. Antecedentes patológicos e imunizações | 76 |
| 4.7.4. Fatores nutricionais | 77 |
| 4.7.5. Fatores ambientais | 79 |
| 4.8. Análises univariadas entre fatores epidemiológicos e resposta DTH na visita de seguimento sem casos de LV | 81 |
| 4.9. Análises univariadas entre fatores epidemiológicos e variação do DTH no estudo de coorte | 84 |
| 4.10. Modelo logístico com resposta multinomial | 90 |
| 4.11. Padrão de citocinas e quimiocinas produzidas por células mononucleares, após estimulação com antígenos de <i>L. infantum chagasi</i> , oriundas do sangue periférico dos indivíduos de acordo com resposta ao DTH | 91 |
| 4.12. Padrão de citocinas e quimiocinas produzidas por células mononucleares, após estimulação com antígenos de <i>L. infantum chagasi</i> , oriundas do sangue periférico dos indivíduos de acordo com variação ocorrida no status DTH e passado de leishmaniose visceral | 94 |
| 4.13. Padrão de citocinas e quimiocinas produzidas por células mononucleares, após estimulação com antígenos de <i>L. infantum chagasi</i> , oriundas do sangue periférico dos indivíduos sem história de LV, de acordo com a resposta DTH e a variação ocorrida no status na coorte | 97 |
| 5. DISCUSSÃO | 100 |
| 6. CONCLUSÕES | 110 |

| | |
|--|-----|
| 7. APÊNDICES | 112 |
| 7.1. Questionário | 111 |
| 7.2 Termo de consentimento livre e esclarecido | 115 |
| 7.3 Publicações relacionadas a tese | 119 |
| 7.4 Artigo | 120 |
| 8. REFERÊNCIAS | 153 |
| 9. ABSTRACT | 169 |

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Distribuição mundial da leishmaniose visceral | 9 |
| Figura 2. Distribuição espacial dos municípios com casos de LV no Brasil, 1989 a 2007 | 11 |
| Figura 3. Transmissão de LV humana no Rio Grande do Norte, de acordo com a média de casos humanos por município, no período de 2008 a 2010 | 17 |
| Figura 4. Dicotomia Th1/Th2 nas leishmanioses | 28 |
| Figura 5. Local do estudo | 42 |
| Figura 6. Fluxograma da amostra constituída no estudo de coorte a partir de estudo familiar anteriormente realizado | 57 |
| Figura 7. Distribuição percentual dos participantes nos municípios de residência. | 59 |
| Figura 8. Distribuição por faixa etária em quinquênios e curva normal dos entrevistados | 60 |
| Figura 9. Proporção de indivíduos por classificação de IMC | 66 |
| Figura 10. Frequencia percentual encontrada de anemia nos adultos, de acordo com sexo, e na população infantil | 68 |
| Figura 11. Número de indivíduos por intervalo de anos da coorte | 69 |
| Figura 12. Curvas lineares da resposta DTH e absorbância de anticorpos em indivíduos com leishmaniose visceral de acordo com o tempo pós- tratamento | 74 |
| Figura 13. Mediana da idade dos indivíduos conforme resultado do DTH | 75 |
| Figura 14. Curva linear entre DTH em mm e idade em anos | 76 |
| Figura 15. Mediana do número de casos de LV humana, nos últimos 6 anos, na região do domicílio dos indivíduos, e resultado da reação DTH | 80 |

| | |
|---|----|
| Figura 16. Mediana do número de casos de LV, nos últimos 6 anos, na região do domicílio dos indivíduos, e resultado da reação DTH na amostra sem casos de LV | 83 |
| Figura 17. Mediana da idade e intervalo interquartil entre hipertensos ou não na amostra sem casos de LV | 84 |
| Figura 18. Mediana da idade entre os indivíduos mantenedores e perdedores da resposta DTH na coorte | 85 |
| Figura 19. Gráficos de comparação das citocinas (pg/ml) IFN- γ , TNF α e IL12 produzidas pelas PBMCs após estímulo antigênico, de acordo com resposta ao DTH | 92 |
| Figura 20. Gráficos de comparação das citocinas (pg/ml) IL4, IL10, IL6, e IL7 produzidas pelas PBMCs após estímulo antigênico, de acordo com resposta ao DTH | 92 |
| Figura 21. Gráficos de comparação das quimiocinas CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 produzidas pelas PBMCs após estímulo antigênico, de acordo com resposta ao DTH | 93 |
| Figura 22. Gráficos de comparação das citocinas (pg/ml) IFN- γ , TNF α , IL12 e IL6, produzidas pelas PBMCs após estímulo antigênico, de acordo com variação ocorrida no status DTH e passado de LV | 95 |
| Figura 23. Gráficos de comparação das citocinas (pg/ml) IL4, IL 10, IL 7 e as quimiocinas CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 produzidas pelas PBMCs após estímulo antigênico, de acordo com variação ocorrida no status DTH e passado de LV | 96 |
| Figura 24. Curva linear entre DTH em mm e níveis de IFN- γ nos indivíduos assintomáticos | 98 |

Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Número de famílias e indivíduos de acordo com a evolução frente à infecção por leishmânia. Adaptado de Jerônimo, S.M.B. et al. Scand J Infect Dis 36: 443-449, 2004 | 56 |
| Tabela 2. Frequência de possíveis fatores relacionados com alteração da imunidade na população estudada | 62 |
| Tabela 3. Frequência dos fatores epidemiológicos relacionados com exposição à leishmânia presente nos entrevistados | 64 |
| Tabela 4. Presença de animais nos peridomicílios e mediana (IQR) encontrada | 64 |
| Tabela 5. Frequência do risco de complicações metabólicas, de acordo com circunferência abdominal e cintura quadril, nos entrevistados | 66 |
| Tabela 6. Dados hematimétricos, da serie vermelha e eosinófilos, de acordo com sexo e faixa etária | 68 |
| Tabela 7. Frequência dos entrevistados, conforme os fenótipos, na primeira e segunda visita da coorte | 69 |
| Tabela 8. Variação da classificação fenotípica dos indivíduos, entre as duas visitas realizadas | 70 |
| Tabela 9. Variação de positividade ao teste de Montenegro (DTH), entre as duas visitas realizadas | 72 |
| Tabela 10. Características dos indivíduos estudados, quanto à absorbância do extrato solúvel de antígenos (SLA), mensuração do DTH e idade, na primeira e segunda visita da coorte, considerando LV sintomática e infecção assintomática | 73 |
| Tabela 11. Análises univariadas de acordo com a positividade da intradermorreção de Montenegro e fatores individuais | 78 |
| Tabela 12. Análises univariadas de acordo com exposição ambiental e positividade da intradermorreção de Montenegro | 80 |
| Tabela 13. Análises univariadas de acordo com fatores individuais e positividade a intradermorreção de Montenegro na amostra sem casos de LV | 82 |
| Tabela 14. Análises univariadas de acordo com exposição ambiental e positividade a intradermorreção de Montenegro na amostra sem casos de LV | 83 |
| Tabela 15. Análises univariadas dos fatores epidemiológicos com a perda da resposta DTH pelo estudo de coorte | 87 |

| | |
|---|----|
| Tabela 16. Análises univariadas dos fatores epidemiológicos com a modificação da resposta DTH pelo estudo de coorte | 88 |
| Tabela 17. Análises univariadas dos fatores epidemiológicos com a modificação da resposta DTH pelo estudo de coorte (sem casos de LV) | 89 |

Quadros

| | |
|--|----|
| Quadro1. Risco na mudança do status DTH do indivíduo no estudo coorte, em função da existência de casos de calazar na família, com correção sobre o tempo | 90 |
| Quadro2. Níveis de citocinas e quimiocinas liberadas por células mononucleares do sangue periférico, após estimulação com antígenos de <i>L. i. chagasi</i> , testadas na segunda visita da coorte, nos indivíduos sem histórico de LV | 99 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-------|---|
| AIDS | Acquired immunodeficiency syndrome |
| BCG | Bacille Calmette-Guérin |
| CPS | Coordenadoria de Promoção à Saúde |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| DP | Desvio padrão |
| DTH | Hipersensibilidade do tipo tardia |
| EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid |
| ELISA | Ensaio imunoenzimático |
| gp63 | Glicoproteína 63 |
| HAS | Hipertenão arterial sistêmica |
| Hb | Hemoglobina |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IFI | Imunofluorescência indireta |
| IFN | Interferon |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IL | Interleucina |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| iNOS | Enzima óxido nítrico sintase induzida |
| IP-10 | Inducible Protein 10 |
| IQR | Interquartil range |
| kDNA | DNA do cinetoplasto |
| Lic | <i>Leishmania infantum chagasi</i> |

| | |
|-------|--|
| LPG | Lipofosfoglicano |
| LV | Leishmaniose Visceral |
| LVA | Leishmaniose Visceral Americana |
| MIG | Monokine Induced by IFN |
| mRNA | Messenger Ribonucleic acid |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| Opas | Organização Pan-Americana da Saúde |
| PBMCs | Peripheral blood mononuclear cells |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| Phox | Enzima oxidase fagocítica |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism |
| ROI | Intermediários reativos de oxigênio |
| SESAP | Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio G. do Norte |
| SLA | Extrato solúvel de antígenos |
| SUVAM | Subcoordenadoria de Vigilância Ambiental |
| T reg | Celulas T regulatórias |
| TGF | Transforming growth factor |
| Th | T helper |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| VSH | Velocity of hemosedimentation |
| WHO | World Health Organization |

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença ocasionada por protozoários do complexo *Leishmania donovani*, cuja infecção possui espectro clínico variando desde infecção assintomática a doença ativa caracterizada por febre, caquexia, hepatoesplenomegalia e imunossupressão. A cura ou proteção exigem uma imunidade antígeno específica do tipo 1. O teste cutâneo de Montenegro (DTH) tem sido interpretado como um marcador de imunidade protetora. No entanto, não se sabe a correlação do DTH com a resposta tipo 1 e se o DTH e a imunidade do tipo 1 são mantidos a longo prazo. Assim, um estudo longitudinal de 8 anos, aninhado a uma coorte familiar realizada no Brasil, documentou o status do DTH e a produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico em resposta a estímulo antígeno-específico. Os resultados obtidos mostram que 46,2% dos indivíduos analisados foram DTH positivos no início do estudo. A prevalência do DTH positivo e o tamanho da endureção aumentaram com a idade ($p = 0,0021$). 15,7% dos indivíduos DTH positivos “retroconverteram” a negativos e 50,4% (64) dos indivíduos DTH negativos tornaram-se positivos. O tamanho da endureção do DTH correlacionou-se significativamente com a produção antígeno induzida de IFN- γ ($r=0,6186$, $p=0,0001$). IL-6 foi secretado em níveis mais elevados por células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos que “retroconverteram” de DTH positivo para negativo do que os indivíduos que mantiveram o status de DTH estável ($p=0,005$). Assim, o IFN- γ , produzido por células mononucleares do sangue periférico, pode ser um marcador substituto para a imunidade protetora em vez da resposta DTH. Além disso, as diferenças na resposta imune inata podem determinar se os indivíduos mantêm ou eliminam a infecção por *L. infantum chagasi* em assintomáticos.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma doença ocasionada por protozoários do complexo *Leishmania donovani*, cuja infecção possui espectro clínico variando desde infecção assintomática, documentada pelo teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) ao antígeno de leishmania (teste de Montenegro), a doença ativa caracterizada por febre, caquexia, hepatoesplenomegalia e imunossupressão (1).

Interações coordenadas entre os componentes da resposta imune-celular, como a ativação de células T, específicas para a produção de citocinas do padrão Th1, o recrutamento de células imunes efetoras para o local da infecção, induzidas por quimiocinas, e a ativação de macrófagos são cruciais para a resolução de infecção pela leishmânia (2;3). No modelo humano e experimental, o desenvolvimento de resposta Th1 está associado com o controle de infecção e a resposta Th2 com a progressão da doença (4-6).

Indivíduos com forma subclínica de LV mostram uma forte resposta proliferativa celular e DTH positivo, produzindo maiores níveis de IFN- γ do que aqueles que evoluíram para doença (7;8). Além disso, a resposta DTH positiva tem se mostrado associada, como marcador fenotípico, ao desenvolvimento de resistência adquirida à doença (9), estando relacionada com genes ligados à capacidade de montar uma resposta imune adquirida à infecção por *Leishmania infantum chagasi*, medida pelo teste de Montenegro (10;11).

No Brasil, a doença era focalizada inicialmente em áreas agrícolas rurais e caracterizada por casos esporádicos (12). Contudo, nos últimos anos, a LV se expandiu até as metrópoles, favorecida pelo crescimento urbano desestruturado (13-15). Esse aumento populacional das grandes cidades, oriunda de migração rural-urbana (13-16), entre os quais indivíduos e/ou seus cães infectados, aliado ao acúmulo de lixo doméstico, propícios à proliferação do *Lutzomia Longipalpis*, principal vetor da *L. infantum chagasi*, no ambiente peridomicilar (17), proporcionaram a formação de um ciclo urbano de transmissão. Como consequência, houve a infecção de um importante contingente de residentes que evoluíram em sua maioria para as apresentações subclínicas ou assintomáticas, cuja exposição é detectada, em estudos epidemiológicos, pela reação positiva ao DTH (18-22).

Por outro lado, hipóteses sugerem que possa haver um subconjunto de pessoas com infecção assintomática que aparentemente não desenvolvem teste cutâneo positivo (23) ou que se tornaram negativos com o tempo, como observado em Bangladesh (24). A existência desses grupos precisa ser definida, pois desta forma uma quantidade maior de infectados previamente estão sendo classificados inadequadamente e podem subestimar um contingente maior de indivíduos que foram expostos à leishmânia, principalmente nas áreas urbanas. Nesses locais, a leishmânia torna-se um importante agente de infecção oportunista em pacientes imunossuprimidos, como AIDS, com formas clínicas diversificadas ou fatais e recaídas pós-tratamento, além de renais crônicos e transplantados, habitualmente residentes em grandes cidades, (25;26). Essa sobreposição, com áreas de

imunossuprimidos, alerta para riscos futuros de forte impacto no perfil clínico e epidemiológico dessas doenças (27).

Do mesmo modo, hipóteses buscam explicar quais fatores levam à longevidade da resposta celular a *L. infantum chagasi*, traduzida pela permanência da positividade ao DTH ao longo do tempo. Imunocompetência, estimulação de citocinas do tipo Th1 e persistência do parasita são prováveis fatores. Ademais, a associação entre uma resposta permanentemente positiva ao DTH e proteção contra o desenvolvimento das formas clínicas é outra lacuna presente no conhecimento da evolução natural da leishmaniose visceral.

Adicionalmente, há ainda a necessidade de demonstrar qual a influência que os tipos de antígenos de leishmania, utilizados no teste cutâneo de DTH, possuem sobre sua sensibilidade. Estudos revelam que, quando a espécie de leishmania, utilizada como fonte de antígeno, não é a mesma causadora de infecção no local avaliado, o teste cutâneo pode mostrar-se com baixa sensibilidade (28).

Assim, uma compreensão dos fatores determinantes que levam à cura clínica pós infecção, com manutenção ou perda da resposta ao DTH, e quais são os parâmetros imunes de resistência ou risco para o desenvolvimento da doença são muito importantes para o entendimento da relação do parasito-hospedeiro.

1.1.OBJETIVOS

1.2. Objetivo geral

O objetivo deste estudo é identificar os fatores condicionantes da manutenção da resposta ao DTH em indivíduos com história de infecção para *L. infantum chagasi* em áreas endêmicas.

1.3. Objetivos específicos

1. Determinar a história natural e mecanismo(s) envolvido(s) na manutenção da resposta a antígenos de leishmânia (DTH).

2. Avaliar se a resposta DTH positiva é um marcador de controle da infecção por *L. infantum chagasi*.

3. Determinar se a manutenção ou perda do DTH é associada com citocinas do tipo Th1 e/ou Th2.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico

A leishmaniose visceral (LV) ou Calazar é uma doença ocasionada por protozoários do complexo *Leishmania donovani*, que parasitam células do sistema retículo endotelial e que determina alterações clínicas caracterizadas por febre irregular de longa duração, palidez cutâneo-mucosa, perda de peso e hepatoesplenomegalia, além de outras alterações clínicas e laboratoriais marcantes (29).

Os primeiros relatos textuais da LV se seguem a 1858, quando o governo britânico assume formalmente o poder sobre a Índia. Na época, o governo de Bengal, região do Nordeste indiano, tornou-se interessado por relatos de uma epidemia da febre quinino-resistente que ocorria no distrito de Burdwan. A consequência da epidemia foi enorme em virtude da mortalidade elevada, impactando na produtividade das terras e nas receitas do governo. Posteriormente, oito a dez anos após a epidemia da “Febre de Burdwan”, na região de Garo Hills, localizada ao sudoeste, autoridades chamavam atenção para uma particular e virulenta febre, que se assemelhava à malária e que estava dizimando a população. Esta doença foi localmente conhecida como Kala-azar ou doença negra (do hindu: Kala=negro, azar=doença, afecção), assim chamada pelo escurecimento da pele nas extremidades e no abdômen, que é um sinal da forma indiana da doença (30).

Anteriormente ao ano de 1820, a história do calazar é imprecisa. Vários são os relatos, na Índia, de casos de doenças febris acompanhados de anemia com e sem esplenomegalia que faziam diagnóstico diferencial com malária,

mas que não tinham confirmação etiológica e que foram aventados como possíveis casos de calazar. Seguidamente, já em 1824, surgiram os primeiros relatos de epidemias no vilarejo de Mahomedpore, região de Bengal, cujos pacientes apresentavam aumento do fígado e baço associados com febre intermitente ou remitente, de aparência semelhante à febre tifóide e que freqüentemente evoluíam para a morte, chegando a se disseminar por regiões vizinhas e quase a despovoar vilas inteiras (30).

Apenas em 1900, o Tenente-General escocês William Boog Leishman, patologista do exercito britânico, observou corpos ovais quando examinou espécimes patológicos do baço de um soldado que havia morrido de calazar e que tinha estado na região de Dum Dum na Índia. Leishman publicou o caso no *British Medical Journal* em 1903, onde relatou ter vários desses casos e que tinha encontrado, nos exames patológicos, formas mortas e degeneradas de tripanossomas, sugerindo timidamente que o calazar era uma forma de tripanossomíase (30;31).

Em julho de 1903, Charles Donovan, professor de fisiologia na medicina do *Madras College*, localizada em Chennai, Índia, descreveu um parasita desconhecido que havia descoberto na polpa do baço, encontrado durante a vida e na autópsia de casos de febre remitente com esplenomegalia e que posteriormente foi descrito como semelhante ao relatado por Leishman (30;31).

Dando continuidade às descobertas, Ronald Ross, médico sanitaria e entomologista, nascido em Almora, publicou um artigo no *British Medical Journal*, em novembro 1903, contrapondo-se com a “Teoria Leishman” de que os corpos encontrados na polpa do baço eram tripanossomas degenerados. Na ocasião, ele sugeriu que se tratava de um novo parasita semelhante à doença

que Donovan havia descrito, considerando assim um gênero novo e que, portanto, devia ser chamado de *Leishmania donovani*. Uma vez que a *Leishmania donovani* tinha sido identificada como o organismo causador do calazar, notícias de sua existência e isolamento do parasito vieram de outras áreas, como o Sudão, em abril de 1904 e, dois meses mais tarde, o Egito, onde hoje a doença ainda é endêmica (30;31).

A participação dos cães como reservatórios da leishmaniose foi descrita por Charles Nicolle em 1908 através de estudos experimentais, no entanto, foi apenas em 1942, quase quarenta anos depois da demonstração de reservatórios, que se mostrou a participação de flebotomíneos como vetor do calazar (30), fechando assim o ciclo dessa zoonose.

O primeiro relato do calazar no Brasil foi feito em 1934, quando foram encontradas, por Henrique Penna, amastigotas de leishmânia em cortes histológicos do fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela (12). Foi desse modo que ele, ocasionalmente, encontrou 41 casos de leishmaniose visceral, a maioria, em crianças da região Nordeste, principalmente Ceará e três casos no Norte, todos no Pará. Posteriormente, em 1937, Evandro Chagas e Marques da Cunha descrevem o parasito no Brasil com suas peculiaridades e diferenças do descrito na Índia e denominam o novo agente infeccioso de *Leishmania chagasi* (32). Contudo, somente 17 anos (1955) depois, é que se registrou o primeiro surto da doença ocorrido em 1950 na cidade de Sobral, no Ceará, em áreas rurais localizadas nos “pés de serras” (33). Posteriormente, já em meados dos anos 80, a doença passa por uma transformação drástica na sua distribuição geográfica, antes restrita às zonas rurais do Nordeste brasileiro, avançando para outras regiões indenes,

alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos do Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (34).

2.2. Características da leishmaniose visceral

Considerada primariamente como uma zoonose, a leishmaniose visceral, a exemplo das leishmanioses, podem acometer o homem, quando ele entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito (35). Causada por protozoários intramacrófagos é uma doença que se caracteriza pela diversidade e complexidade das apresentações clínicas, abrangendo uma ampla gama de manifestações. A infecção permanece assintomática ou subclínica, em muitos casos, ou pode seguir evolução aguda, subaguda ou crônica. O calazar clássico é uma síndrome exemplificada pelos pacientes que estão fortemente infectados em todo o sistema mononuclear fagocitário e desenvolvem um quadro progressivo, com risco de vida, após um período de incubação de semanas a meses (29).

2.3. Epidemiologia

A leishmaniose visceral encontra-se mundialmente distribuída, com registro em 65 países, sendo que 90% dos casos notificados ocorrem em áreas rurais e suburbanas de cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (Figura1) (17). É estimado, no mundo, um total de 200 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco, 500.000 novos casos a cada ano e mortalidade anual avaliada em 59.000 casos (17;36).



Figura 1. Distribuição mundial da leishmaniose visceral

Fonte: Adaptado de Desjeux, P. Disease Watch Focus: Leishmaniasis. Nature Rev. Microbiol. 2, 692–693 (2004).

Globalmente são descritos dois padrões epidemiológicos para a ocorrência de casos de leishmaniose visceral. No sul da Ásia e na África subsaariana, a LV se comporta predominantemente como antroponose de transmissão urbana, causada por *Leishmania donovani*, sendo o homem o reservatório e insetos do gênero *Phlebotomus*, o vetor. Na Europa, na região Mediterrânea, e nas Américas, a transmissão é rural e periurbana. É considerada uma antrozoonose, que possui mamíferos domésticos e silvestres como reservatórios, causada, principalmente, por *Leishmania infantum infantum* na Europa e, exclusivamente, por *Leishmania infantum chagasi* nas Américas, e os vetores são insetos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, respectivamente (37). Em alguns países da África e da Ásia, há infecção tanto por *L. donovani* quanto por *L. infantum infantum* (38).

Não obstante, mudanças no padrão epidemiológico dos casos de LV vêm sendo observadas no mundo, desde o início da década de 90. Essa situação causou preocupação às autoridades sanitárias mundiais, devido à elevação das taxas de incidência, além de expansão das áreas afetadas e o processo de urbanização. Fatores, como êxodo rural e migração urbano-rural, além de zonas de conflitos e fenômenos naturais são apontados como facilitadores dessa mudança (39).

Na Índia, estima-se que cerca de 100.000 casos ocorrem anualmente. Saliente-se que, o estado de Bihar responde por mais de 90% dos casos (40). Na região de Bangladesh, um estudo de casos revelou incidência anual de 2%, com letalidade elevada, principalmente na faixa etária adulta do sexo feminino (19%). Os pacientes são oriundos das áreas rurais, caracterizadas por extrema pobreza e com dificuldade ao acesso dos serviços de saúde, ocasionando, portanto, retardo no tratamento dos doentes e prolongamento da transmissibilidade, por lá ser uma antroponose (41).

Na África ocidental, o fenômeno de migração de refugiados e trabalhadores temporários de áreas endêmicas para não endêmicas favorece a disseminação da LV, determinando novas áreas de transmissão. Esse padrão foi constatado na região do Sul do Sudão, onde uma epidemia ocasionou 100.000 mortes em uma população de 1.000.000 de pessoas (42). Diferentemente, na região do Mediterrâneo, os casos de LV, que inicialmente eram apenas na faixa etária infantil (daí o nome de *L. infantum*), somente começaram a ganhar a atenção quando a coinfeção com o “Human immunodeficiency virus” (HIV) foi documentada. Tal fato foi observado entre os

anos 1980 e início de 2001, quando mais de 1.900 casos foram notificados no Sudoeste da Europa (43).

Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, onde é amplamente distribuída, estendendo-se desde o México, ao norte, até a Argentina, ao sul. Até 1984, estimava-se, no entanto, que mais de 90% dos casos registrados no Novo Mundo eram do Brasil e, de um total de 8.959 casos registrados no país, 7.882 (88%) eram da região Nordeste e 992 do Sudeste (44;45).

Contudo, a leishmaniose visceral no Brasil se expandiu surpreendentemente nos últimos anos, desde as pequenas cidades (menor que 100mil habitantes) até as metrópoles, ocupando espaço nas regiões Norte, Centro-Oeste e, mais recentemente, no Sudeste e Sul do país (13-15). Do total de casos notificados no ano 2000, 83% (4.029/4.858) ocorreu na região Nordeste. Posteriormente, houve uma expansão gradativa para as regiões Norte, Sudeste e Centro Oeste, que juntas passaram de 17,1% (829/4.858), do total de casos em 2000, para 52% (1.665/3.204), do total de casos em 2007. Ficando assim, neste ultimo ano, a região Nordeste responsável por 48% (1.533/3.204) das notificações (Figura 2) (46;47). Os últimos dados disponíveis do Ministério da Saúde informam que, até o ano de 2010, 21 unidades federadas já registraram casos autóctones.



Figura 2. Distribuição espacial dos municípios com casos de LV no Brasil, 1989 a 2007. Fonte: OPAS. Indicadores básicos para a saúde no Brasil: conceitos e aplicações. 2 ed. Brasília: 2008

Juntamente com o fenômeno da expansão territorial, a urbanização da leishmaniose visceral no Brasil tem mantido elevadas as taxas nacionais. Antes de 1980, quase todos os pacientes eram de áreas rurais ou pequenas vilas, embora alguns casos já houvessem sido relatados em cidades menores desde 1950 e em cidades um pouco maiores, como Sobral e Aracati, no Ceará, Jacobina, na Bahia, e Santarém, no Pará (48). Posteriormente, já no ano de 1981, ficou mais evidente o início da urbanização em Teresina, capital do Piauí, onde 55 casos da doença foram notificados, diferentemente das notificações esporádicas de casos importados durante o ano. No ano seguinte, o processo de urbanização apareceu em São Luís, Maranhão, e Montes Claros, Minas Gerais, expandindo-se depois para várias outras grandes cidades (13).

No Nordeste brasileiro, a LV começou a preocupar as autoridades a partir de 1950, quando, na cidade de Sobral, estado do Ceará, foram notificados 177 casos, cujos pacientes eram predominantemente (96%) oriundos das zonas rurais. Já nas últimas décadas, diferentemente do que ocorreu no início, as capitais São Luís (Maranhão), Teresina (Piauí), Natal (Rio Grande do Norte), Aracaju (Sergipe) e Fortaleza (Ceará) foram as localidades mais acometidas (33).

Apesar do decréscimo de casos nos últimos anos (1990 a 2008) e da expansão da LV para outras regiões, o Nordeste brasileiro notificou 41.587 casos confirmados em todos os estados da região, com média de 2.189 casos por ano. As maiores incidências ocorreram nos estados da Bahia (12.376), Maranhão (8.157), Ceará (5.894) e Piauí (5.557) (49).

A mudança epidemiológica da LV no Brasil deve-se a quatro novos eventos iniciados após a década de 80: (i) a transmissão da doença em áreas

completamente urbanizadas; (ii) a propagação rápida, no Nordeste e em várias cidades no Norte, Centro-Oeste e Sudeste; (iii) a grande proporção de casos urbanos versus rurais e, por fim, (iv) o surgimento de grandes epidemias urbanas com ciclos de dez anos (13). Acredita-se que esse processo de urbanização está relacionado às alterações do ambiente, migração populacional, interação e disseminação de reservatórios silvestres e cães infectados em áreas sem transmissão, além da adaptação do vetor *Lutzomyia longipalpis* ao ambiente peridomiciliar (33).

Várias são as observações que buscam elucidar as causas das mudanças ocorridas e o impacto na morbi-mortalidade. Especula-se que áreas recentemente afetadas tendem a apresentar elevadas incidências, já que a *L. infantum chagasi* determina imunidade. Portanto, quando a população não está imune, os casos ocorrem, em média, nos mais velhos, faixa também mais susceptível à letalidade. Outra possibilidade é a associação da ocorrência dos casos, que são agrupados nas periferias urbanas, com moradia em áreas limítrofes com zonas de florestas e pastagens verdes, regiões de maior contato com os vetores e reservatórios silvestres. Secas em regiões endêmicas parecem ter facilitado as epidemias, ocasionando a emigração dos seres humanos e cães infectados para as cidades. A invasão das cidades por *Lu. Longipalpis* se deveria as mudanças ecológicas, com atrativos biológicos urbanos, pois os flebotomíneos têm hábitos alimentares bastante diversificados (13;33;34). Todavia, as hipóteses levantadas até agora, em relação ao processo de urbanização, parecem não conseguir explicar o fenômeno inteiro e são, portanto, ainda insuficientes.

No Rio Grande do Norte, semelhantemente aos outros estados do Nordeste, a doença era inicialmente endêmica em regiões rurais. Contudo, após o ano de 1989, ela tornou-se urbana, determinando uma epidemia na cidade do Natal, no qual 316 casos foram relatados até o ano de 1992, sendo 49% em crianças menores de cinco anos de idade (50). O sexo masculino foi mais acometido no total dos casos (relação de 1,7), entretanto, nos menores de cinco anos houve leve inversão (relação de 0,8). A maioria dos casos era dos distritos norte e oeste da cidade, locais compostos por áreas periféricas de transição urbana e vegetação, que anteriormente tinham casos esporádicos. Febre, perda de peso, dor abdominal e fadiga foram os principais sintomas, acompanhados de neutropenia, anemia e hipergamaglobulinemia. *L. infantum chagasi* foi a espécie isolada. Cerca de um terço dos contactantes intradomiciliares e vizinhos dos casos tinham o teste de Montenegro positivo, mas com predominância de positividade maior se eles eram moradores intradomiciliares.

Posterior estudo, para caracterizar o padrão e o espectro clínico da infecção por *L. infantum chagasi* no ambiente urbano de Natal, foi realizado. Avaliação clínica e laboratorial de famílias residentes nas áreas endêmicas permitiu identificar quatro grupos compostos por indivíduos: com presença de leishmaniose visceral (LV+); com infecção assintomática com controle imune, determinado pela presença de uma resposta de hipersensibilidade retardada (DTH +) positiva sem história de LV; com resultados de DTH negativos, mas anticorpos anti-Leishmania positivos (Ab+); DTH negativo e anticorpos antileishmania negativos (21).

Os resultados revelaram que 12% dos indivíduos apresentavam LV, 35% tinham autoresolução de infecção sem sintomas (DTH+) e 1,9% mostrou evidências de infecção assintomática aguda ou recente (Ab+). A proporção de indivíduos sintomáticos, infectados por *L. chagasi*, foi de 25% em relação a todas as infecções documentadas. A média de idade dos pacientes com LV ativa foi de 11,4 anos, havendo um progressivo declínio do número de casos à medida que havia aumento da idade. Quanto aos fatores ambientais, a presença do cão no domicílio não foi associada com casos de LV e não houve aumento significativo no número de cães em famílias com indivíduos assintomáticos (DTH +), sugerindo que a posse desses animais parece não aumentar o risco de infecção assintomática com *L. infantum chagasi* (21).

Apesar do que foi anteriormente descrito, quanto ao papel do reservatório canino na epidemiologia da LV no estado, outro estudo mostrou a existência de sobreposição em curvas temporais nas distribuições de casos humanos e caninos de LV no Rio Grande do Norte (51). Além do mais, grande porcentagem de cães com infecção inaparente foi detectada (83,3%), associada às áreas de alta prevalência vetorial, caracterizadas pela presença de *Lu. Longipalpis*.

Assim, podemos inferir que, ao analisarmos o domicílio, o cão não se mostra associado com casos de infecção humana; mas, ao analisarmos os aglomerados humanos, o cão infectado se mostra relacionado com a presença de infecção entre os residentes. Talvez isso se deva às características de criação desses animais nas regiões de periferia, em que ficam soltos e vagueiam pelas ruas, sendo fontes ambulantes de leishmanias, além do que flebotomíneos possuem autonomia de voo de até 1.000m (52;53). Isso

determina a necessidade de evidência da participação dos cães na epidemiologia da LV em nosso meio, a exemplo de outros locais, para que haja, assim, a identificação precoce dos animais positivos, potenciais fontes de protozoários aos flebotomíneos e, posteriormente, aos seres humanos.

Quanto à prevalência vetorial, observa-se a abundância de *Lu. longipalpis* nas áreas periurbanas da região leste do Rio Grande do Norte, incluindo a região metropolitana de Natal, predominantemente no mês de maio, demonstrando atividade temporal e acentuado grau de adaptação dessa espécie às áreas sob influência antrópica (54;55). A presença de vetores e distribuição de casos, nessa região, estão associadas a características demográficas, crescimento desordenado da área metropolitana, condições de vida e degradação ambiental, fatores estes de difícil controle por parte dos entes públicos (55). Adicionalmente, a criação de animais no peridomicílio, prevalente em regiões periféricas, fornece abrigo e alimento aos flebotomíneos, aumentando o risco de transmissão de *L. infantum chagasi* (56).

Análise temporal, durante o período de 1990 a 2009, revelou que o Rio Grande do Norte registrou um total de 2836 casos de leishmaniose visceral, predominando no sexo masculino, em crianças até os 10 anos de idade e com taxa de letalidade de 5,7%. Os casos abrangem principalmente seis municípios: a capital (Natal) e mais quatro municípios da região perimetropolitana, a saber, Parnamirim, Macaíba, São Gonçalo do Amarante e Ceará-Mirim, além de Mossoró, na região oeste do estado. Juntos, esses municípios notificaram 60% do total dos casos de LV durante o período (27).

O município de Mossoró, segunda cidade do estado em número de habitantes, com população de 234.389 habitantes, vem recentemente sendo o

local de expansão da doença (57). Apesar de possuir clima semiárido e registrar baixas pluviosidades anuais, diferentemente da área perimetropolitana do Natal, a LV vem se mantendo de forma epidêmica nessa localidade, contribuindo com 50% dos casos notificados no estado nos últimos dois anos. No mesmo período, observa-se em Mossoró um crescimento na taxa de infecção canina, com cerca de 46% dos animais testados infectados por leishmânia. Além do mais, o vetor *Lu. longipalpis* é, contrariamente ao que ocorre no litoral leste, encontrado em abundância em todos os meses do ano, em todas as localidades do município, onde são realizadas pesquisas entomológicas (58).

Por fim, a presença de aglomerados de casos de LV nas cidades mais urbanizadas do estado, que compreendem a região litorânea leste do estado e a cidade de Mossoró (figura 3), também áreas de maior notificação de casos de AIDS (57), predizem alterações no aspecto clínico e epidemiológico das duas doenças no estado, levando à ocorrência de casos de LV associados à imunossupressão, que cursam com maior gravidade e tratamento mais complexo, conforme observado em outros países (59;60).

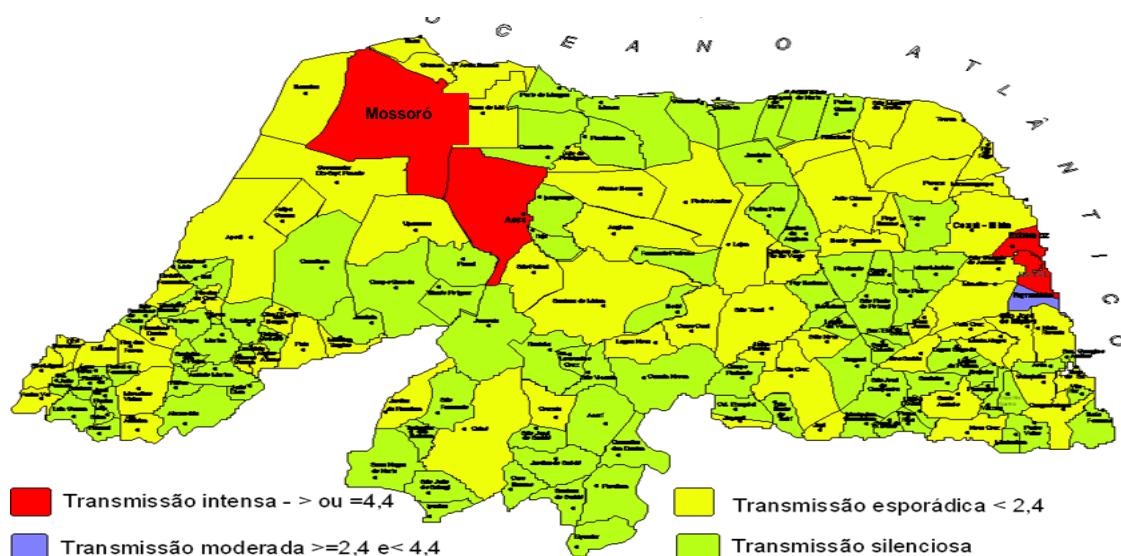


Figura 3. Transmissão de LV humana no Rio Grande do Norte, de acordo com a média de casos humanos por município, no período de 2008 a 2010. (Fonte: SUVAM/CPS/SESAP)

2.4. Agente etiológico, reservatórios e transmissão vetorial da leishmânia

O agente etiológico é um protozoário pertencente ao filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e espécie *donovani*. Como causador da leishmaniose visceral são conhecidas três espécies pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (29): a que agrupa *Leishmania (L.) donovani*, que é agente causador de uma antroponose na Índia e em algumas regiões da África, onde o homem é o único hospedeiro mamífero encontrado infectado, sendo, portanto o único reservatório; a *L. (L.) infantum* encontrada em parte do continente asiático, africano e europeu, sendo agente etiológico de uma zoonose de canídeos silvestres, tendo o cão como reservatório doméstico do protozoário; e a *L.(L.) chagasi*, que é agente causador da zoonose no Novo Mundo, chamada de leishmaniose visceral americana (LVA), com forma idêntica à *L. (L.) infantum* (32).

Quanto à classificação, a inclusão de *L. chagasi* no complexo *L. (L.) donovani* é amplamente aceita, ainda que sua afinidade taxonômica e origem sejam uma questão polêmica (61;62). Existem divergências quanto à real existência de um novo agente etiológico causador da LVA ou se ele foi introduzido no Novo Mundo à época da colonização européia e, neste caso, deveria ser classificado como *L. infantum*. Trabalhos realizados com as espécies do complexo *L. donovani*, utilizando análises genéticas e fenética, não mostraram distinção entre *L. infantum* e *L. chagasi* e, por isso, acredita-se que os parasitos constituem uma única espécie (63-65), além do que, recente revisão propõe uma nova taxonomia, na qual *Leishmania infantum* e *L.*

donovani são as únicas espécies reconhecidas do complexo *L. donovani* (66). Por outro lado, autores baseados em diferenças observadas nas técnicas de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e kDNA (DNA do cinetoplasto) têm usado a nomenclatura *L. L. infantum infantum* e *L. L. infantum chagasi*, sugerindo que a separação taxonômica dos parasitos poderia ser subespecífica (44), o que foi corroborado por outro estudo (67), o qual enfatiza que a última nomenclatura, segundo o código da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica, estaria absolutamente correta.

As leishmânias são parasitas digenéticos apresentando-se sob duas formas morfológicas principais: amastigota, arredondada e intracelular, encontrada dentro dos macrófagos, e promastigota, flagelada e extracelular, encontrada no intestino do inseto transmissor (68). Possuem ciclo de vida heteroxênico, alternando estádios de vida entre hospedeiros mamíferos e invertebrados.

Entre os hospedeiros mamíferos, além do homem, encontra-se grande variedade de espécies, sendo o cão (*Canis familiaris*) o principal reservatório, visto que pode adoecer ou ser portador assintomático e habita o ambiente doméstico (44;69). Essa asserção torna-se mais firme, quando estudos indicam haver uma associação entre a presença de casos caninos e humanos de LV, bem como uma relação entre elevadas taxas de infecção canina e probabilidade de transmissão humana (70), além de demonstrar que a eliminação sumária de cães soropositivos diminuiu a incidência de LV humana e canina nas áreas estudadas (71). Entretanto, outros autores questionam a sua importância como fonte de infecção e ainda sugerem o próprio homem como provável reservatório. Essa afirmação é baseada em dados recentes que

mostram, contrariamente, que a eliminação dos cães soropositivos das áreas endêmicas não proporcionou impacto no decréscimo de infecção em humanos e que a presença de cães soropositivos no peridomicílio não estava associada com infecção humana (72-74). Logo, se faz necessário, como já mencionado, a elucidação da participação do cão doméstico na cadeia de transmissão da LV humana, visto que sua eliminação requer grande aparato logístico da vigilância epidemiológica e produz problemas afetivos aos donos dos animais.

No meio silvestre, animais como a raposa (*Dusicyon vetulus*) e marsupiais como o gambá (*Didelphes albiventris* e *Didelphes marsupialis*) possuem grande importância, visto que são considerados reservatórios naturais de leishmânia e possuem hábitos peridomiciliares, podendo servir como fonte de infecção para cães e humanos (75-77). Vários outros animais como roedores (*Rattus rattus*), edentados (tatu, tamanduá e preguiça) e primatas também já foram encontrados parasitados, mas seus papéis na epidemiologia da doença precisam ser mais bem investigados, considerando-se a ausência, até o momento, de evidências que os coloquem como reservatórios de importância no ciclo de transmissão (44).

Nos invertebrados, a leishmânia estabelece ciclo de desenvolvimento em fêmeas hematófagas de insetos denominados flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomya* e *Psychodopygus* no continente americano e *Phlebotomus* nos demais continentes (35;78). A espécie *longipalpis* é considerada como principal vetor da *L. infantum chagasi* nas Américas (44), embora as espécies *cruz*, *evansi* e, mais recentemente, a *almerioi* também foram descritas como possíveis transmissores (79-81).

Diferentemente de outros vetores de importância no nosso meio, como o *Aedes aegypti*, o ciclo larval do *Lu. longipalpis* não é feito na água e este inseto obedece ao perfil dos flebotomíneos, que fazem seus criadouros na matéria orgânica úmida, o que dificulta seu combate e favorece ainda mais sua adaptação no habitat doméstico e peridoméstico (79;82). Inicialmente, o *Lu. longipalpis* mostrava-se como uma espécie silvestre, mas com capacidade de adaptação aos ambientes peridomiciliares. Mais recentemente, foi visto que o inseto tanto se instala na área rural, habitando tocas de roedores, ocos de árvores velhas e aberturas de pedras, como está adaptado ao meio urbano, onde pode ser capturado em fissuras das casas, abrigos de animais, lixo doméstico e em qualquer ambiente rico em matéria orgânica, calor e umidade (17).

As fêmeas de flebotomíneos necessitam ingerir certa quantidade de sangue para completar seu desenvolvimento ovárico. Nestes insetos, ocorre então o repasto sanguíneo, em que ele utiliza peças bucais rígidas, capazes de penetrar na pele do hospedeiro, incluindo os vasos sanguíneos ali presentes. Nesse momento, podem infectar-se ingerindo formas amastigotas que se encontram livres ou dentro de macrófagos presentes na pele, juntamente com restos celulares e sangue que extravasa dos capilares, vênulas e arteríolas lesados pela picada (68;83). No interior do seu tubo digestivo, o protozoário passa por diversas mudanças morfológicas e fisiológicas, até se diferenciar, em parte, em formas infectantes para o hospedeiro mamífero, denominadas promastigotas metacíclicas (68;83;84). Durante um novo repasto sanguíneo, por regurgitação esofágica, essas formas podem ser transmitidas a um

hospedeiro mamífero susceptível, fechando assim o ciclo de transmissão vetorial (vertebrado reservatório - vetor - vertebrado susceptível).

Depois de inoculadas na pele do hospedeiro mamífero, as promastigotas são internalizadas por células fagocitárias, principalmente macrófagos, através de receptores, ocasião em que perdem o flagelo e se transformam em amastigotas (85). Essas formas são resistentes à ação das enzimas lisossomais, o que lhes permite residir e multiplicar-se no interior dos fagolisossomas, como veremos adiante. A multiplicação dos parasitos dentro dos macrófagos favorece o rompimento da membrana celular e a liberação dos parasitos, os quais infectam outros macrófagos, protegendo-se da ação do complemento e de anticorpos, podendo iniciar nova fase de multiplicação. Seguidamente, macrófagos parasitados podem disseminar-se para órgãos do sistema fagocitário mononuclear, determinando as várias formas clínicas da doença (86).

A leishmânia ainda pode ser transmitida por forma não vetorial, que inclui o uso de seringas contaminadas, hemotransfusão, via transplacentária e contaminação laboratorial ocupacional (87-89). Atualmente, a transmissão por uso de seringas e hemoderivados tem sido importante fonte de aquisição em algumas regiões, principalmente naquelas com alta prevalência de pacientes coinfectados com HIV (90). Na região do Mediterrâneo, onde 70% dos casos de LV são infectados pelo HIV, o padrão tradicional de transmissão vetorial foi modificado pela coinfeção, visto que esses pacientes possuem resposta pobre ao tratamento, grande número de recidivas e alta parasitemia, favorecendo, portanto, a persistência do reservatório humano em áreas de transmissão antroponótica (90). Trabalhos mostram que, nesses casos, pode haver um ciclo

de transmissão artificial com compartilhamento de seringas e agulhas, o que tem sido constatado pela detecção de DNA de leishmânia, por reação em cadeia da polimerase (PCR), em seringas e em amostras de sangue de pacientes HIV positivos (91;92).

2.5. Imunologia

Nas leishmanioses, o parasitismo depende da capacidade de evasão que a leishmânia possui de ambos os sistemas imunes (inato e adaptativo). Interações coordenadas entre os componentes da resposta imune-celular, especificamente a ativação de células T, específicas para a produção de citocinas apropriadas e ativação de macrófagos, são cruciais para a resolução de infecção pela leishmânia. No modelo murino, o desenvolvimento de resposta Th1 está associado com o controle de infecção e a resposta Th2 com a progressão da doença. No entanto, a dicotomia Th1 e Th2, no sistema humano não é tão distinta como em camundongos, e o modelo murino não se aplica estritamente à leishmaniose humana (5;93).

Ao entrar no organismo, as promastigotas de leishmânia sofrem adesão do complemento (C3b) com moléculas de superfície do parasito (gp63 e LPG). Posteriormente, há internalização na célula fagocitária pela interação com receptores do complemento (CR1 e CR3) da superfície da célula (94). Como mecanismo de defesa da leishmânia, a glicoproteína gp63 converte o C3b em iC3b, e essa conversão leva à ausência da lise fagocítica, tornando o parasito resistente à degradação (95).

Neste momento, os macrófagos possuem um importante papel na defesa do hospedeiro, pois são os principais locais de multiplicação da

leishmânia. Após sua ativação, essas células desenvolvem a capacidade de eliminar o parasito a qual resulta da produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI) dependentes da enzima oxidase fagocítica (Phox), e de intermediários reativos de nitrogênio (RNI) dependentes da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ocasionando a produção de enzimas ácidas, radicais superóxidos e hidroxilas (96). Essa ativação é mediada por citocinas geradas por diversas outras células do sistema imune, como também produzidas pelos próprios Macrófagos e são determinantes no curso da doença como IL-12 e TNF- α , responsáveis pela destruição do parasito, bem como IL-10 e TGF- β , favoráveis à multiplicação dos parasitos (97).

Contudo, a leishmania possui o Lipofosfoglicano (LPG), que inibe as enzimas lisossomais, e uma bomba de prótons que mantém o Ph próximo ao neutro, além de produzir fosfatases ácidas que inibem os radicais superóxidos e hidroxilas (2) Desta forma, a leishmânia pode desenvolver mecanismos de sobrevivência à digestão macrofágica e, em seu interior, escapar da ação do sistema imune humoral.

A imunidade humoral nas leishmanioses é caracterizada pelo aparecimento de anticorpos antileishmânia no soro dos pacientes. Altos títulos de anticorpos antileishmânia são bem documentados na forma visceral, embora o papel desses anticorpos para proteção ou patogênese seja ainda obscuro e com resultados ainda controversos. A maioria dos dados nesta área foi obtida em modelos experimentais de leishmaniose cutânea, em que a resistência foi observada com depleção das células B, e a susceptibilidade foi aumentada por transferência dessas células (98). Em contraste, outro estudo não observou qualquer defeito na capacidade desses camundongos mutantes

em controlar a infecção e montar uma resposta Th1 (99). Na leishmaniose visceral, maior resistência também foi demonstrada em camundongos mutantes com ausência de células B (100). Este resultado pode estar relacionado com os títulos muito elevados de anticorpos antileishmânia durante a fase ativa da doença e a queda consecutiva no título de anticorpos após cura bem sucedida.

Na leishmaniose humana e experimental, a imunidade é predominantemente celular, mediada pelos linfócitos T. Eles desempenham papel importante na geração de respostas específicas e de memória para parasitas intracelulares. Estas células apresentam duas subpopulações com funções distintas e com produção de citocinas a depender da resposta. O subtipo Th1 é capaz de produzir IL-2, TNF- β e IFN- γ ; e o subtipo Th2, as interleucinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (5;101;102). O paradigma Th1/Th2 é largamente baseado em investigações com *L. major*, em que a maioria das linhagens de camundongos resistentes (C57BL/6, C3H, CBA) desenvolve doença cutânea autolimitada quando infectados. Nestes camundongos, a resolução da infecção é mediada por células Th1 que produzem IFN- γ , induzindo, posteriormente, a produção de óxido nítrico (NO) em células fagocíticas, levando conseqüentemente à destruição do parasita (103). Nas linhagens de camundongos susceptíveis (BALB/c), há predomínio de citocinas produzidas por linfócitos Th2, sendo a doença progressiva e fatal (1).

Apesar de estabelecido o padrão de resposta Th1/Th2, um mecanismo de contrarregulação entre as subpopulações desses linfócitos tem sido proposto, nele há a participação de células regulatórias induzidas, a exemplo da subpopulação de linfócitos Th3, desenvolvidas a partir da célula TCD4 e

produtoras de TGF β (104). Como exemplo, tem sido demonstrado que a susceptibilidade ou a resistência à infecção pela leishmânia, no modelo murino, estão associadas com o surgimento de células T reguladoras (T_{reg}), fontes potenciais de citocinas IL-10, que são inibidores eficazes da produção de IFN- γ e desempenham papel fundamental na persistência do parasito (105-107). Adicionalmente, a participação das células regulatórias naturais foi descrita como capaz de reativar a infecção crônica por leishmânia, onde a transferência de células T reguladoras (Treg) para camundongos infectados cronicamente foi suficiente para provocar a reativação da doença e impedir a expressão de uma resposta de memória efetora (108).

Estudos *in vitro* têm atribuído a interleucina 6 (IL-6) como uma citocina chave na regulação do desenvolvimento de células T_{reg} (109;110). Os resultados demonstram que a IL-6 desempenha um papel crítico na ativação de células T, superando a supressão mediada por células T_{Reg}. Especificamente na leishmaniose, essa interleucina tem sido demonstrada como supressora da resposta Th2 por controlar a expansão de células T CD4⁺ produtoras de IL-10, favorecendo, portanto, ao controle da infecção (111).

Analogamente ao observado no modelo experimental, estudos de infecções com espécies viscerotrópicas de *Leishmania donovani* (*L. infantum infantum* e *L. infantum chagasi*) em pacientes com LV apresentam evidências de supressão de células Th1 e ativação de células Th2 (6). Aumento na expressão de citocinas Th2 tem sido relatado com níveis elevados de IL-4 e IL-13 em pacientes com doença ativa, voltando ao normal após o tratamento bem sucedido. Células mononucleares de sangue periférico de tais indivíduos não conseguem proliferar ou produzir IFN- γ quando expostas ao antígeno *in vitro*.

A adição de anticorpos anti-IL-10R às células T colhidas desses pacientes restaura as respostas das citocinas, e a cura da doença foi associada com uma queda nos níveis de IL-10 mRNA. Análises em populações de áreas endêmicas mostram que, nos indivíduos com forma subclínica de LV, há uma forte resposta proliferativa e DTH positivo, além de eles produzirem maiores níveis de IFN- γ do que aquelas que evoluíram para doença (7;8).

Entretanto, ainda há a necessidade de maior evidência para a dicotomia da resposta Th1/Th2 na leishmaniose humana. O resultado da infecção provavelmente é determinado pelo equilíbrio entre as duas populações de células T (Figura 4). Além do mais, parece que outros mecanismos também são importantes, havendo evidências de que fatores genéticos e nutricionais do hospedeiro e fatores ambientais desempenham um papel fundamental na determinação da resposta em humanos após infecção por leishmânia (54;112-114). Recentes estudos também analisam o papel das células dendríticas nesse contexto e demonstram que seu mecanismo de apresentação antigênica e de interação celular, pós-infecção por leishmânia, com as células T não é uniforme entre todas as células infectadas (115). Isso sugere a existência de um subconjunto de células dendríticas parasitadas que recebem menos atenção e podem permitir a sobrevivência do parasito. Adicionalmente, outras citocinas menos estudadas podem mostrar-se como importantes na imunorregulação de leishmaniose humana, da mesma forma que o papel das células T reguladoras (T reg) precisa ser melhor estudado.

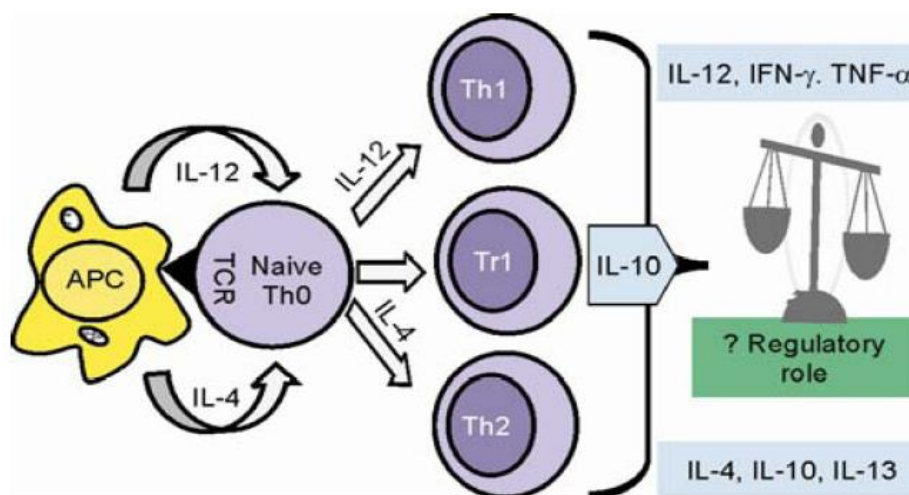


Figura 4. Dicotomia Th1/Th2 nas leishmanioses

Fonte: Adaptado de Sharma U. Indian J Exp Biol 2009;47(6):412-23.

Recentemente, um novo subconjunto de células Th tem sido descrito. Células Th17, produtoras de IL-17, têm sido associadas com inflamação em várias doenças autoimunes, estimulando uma variedade de células (fibroblastos, macrófagos, células endoteliais) a produzir mediadores inflamatórios, incluindo IL-1, TNF- α e quimiocinas (116). Contudo, nas doenças parasitárias em seres humanos, muito pouco é conhecido sobre a produção de IL-17, embora participe de mecanismos de defesa contra certos patógenos (117). Modelos experimentais e humanos com leishmaniose tegumentar revelam que a IL -17 é expressa em células no sangue periférico e em tecidos, havendo associação do número delas com a intensidade do infiltrado inflamatório, determinando a patogênese da lesão (118;119). Por outro lado, estudo em indivíduos com infecção por *L. donovani* evidencia que a IL -17 desempenha papel complementar em matéria de proteção natural contra o desenvolvimento do calazar (120). Assim, estudos adicionais que caracterizem o papel das células Th17, durante infecção por leishmânias, e como essas

células CD4 regulam a diferenciação de células T, mediando os efeitos de proteção, são áreas importantes para investigações futuras.

Tentando-se ainda esclarecer como nosso sistema imune responde à infecção pela leishmânia, as quimiocinas e receptores de quimiocinas têm se mostrado importantes para desempenhar um papel crucial na determinação do resultado da leishmaniose (121). Quimiocinas são citocinas quimiotáticas que coordenam o recrutamento de leucócitos envolvidos na homeostase, tanto na resposta imune inata como na adaptativa. Elas são divididas em quatro subfamílias, dependendo da posição de seus resíduos de cisteína: CC, CXC, CX3C e XC, em que X= aminoácido e C= cisteína. Na subfamília CXC, um aminoácido separa as primeiras 2 cisteínas, enquanto, na subfamília CC, os primeiros dois resíduos de cisteína são adjacentes um ao outro. Cada subfamília possui seu próprio receptor e tem funções diferenciadas uma da outra. As quimiocinas CXC são quimiotáticas para neutrófilos, enquanto as CC não agem neste último grupo celular, atraem monócitos, basófilos e linfócitos(122).

Na leishmaniose visceral, os principais mecanismos mediados pelas quimiocinas ocorrem no baço e no fígado. A produção de CCL2, de CXCL9 ("Monokine Induced by IFN- γ ", MIG) e de CXCL10 (IFN- γ "Inducible Protein 10", IP-10), seguida pelo acúmulo de macrófagos e células Th1 no fígado infectado, resulta na formação de granulomas e eventual resolução da infecção. Contrariamente, ocorre uma comprometida migração e apresentação antigênica entre células dendríticas e células T, promovidas pela regulação de CCL19, CCL21 e CCR7, juntamente com a persistente falta de produção de CXCL10, resultando na persistência do parasita no baço (3). Entretanto, o

verdadeiro papel que as quimiocinas possuem na resposta imunológica global carece de mais profunda compreensão, mas as descobertas, até o momento, possuem potencial na busca de estratégias em defesa do hospedeiro.

Outro fator importante na resposta imune é sua manutenção através de células T CD4 + efectoras, que medeiam respostas de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) e o desenvolvimento da imunidade protetora de longa duração à reinfecção por leishmânias, os quais parecem depender da presença continuada dos parasitas (123). Estudos experimentais revelam que, sob algumas condições, a imunidade induzida pela infecção é perdida e animais previamente imunes tornam-se altamente suscetíveis a reinfecções (124). Essa mudança no perfil de resistência tem sido associada ao completo clareamento dos parasitas, sugerindo, assim, que os parasitas persistentes são importantes para a manutenção das respostas de memória antileishmânia (125;126). Entretanto, ainda é impreciso o completo entendimento dos fatores de persistência do parasita e o seu papel na resposta imune, pois células T de memória central respondem a estímulo antigênico, na ausência de parasitas persistentes, tornando-se efectoras e mediando proteção (127).

Assim, é notório que são necessários estudos para que consigamos compreender integralmente a resposta imune na infecção por leishmânia. Os dados disponíveis até o momento sugerem que mecanismos imunes mais complexos determinam resistência ou suscetibilidade à leishmânia, parecendo ser ainda uma combinação de fatores do hospedeiro com a cepa do parasito, que, em última instância, determina o resultado da doença.

2.6. Quadro clínico

A leishmaniose visceral, do ponto de vista clínico, caracteriza-se por ser uma doença espectral, abrangendo ampla gama de manifestações. A infecção permanece, em muitos casos, assintomática ou subclínica, podendo seguir, no entanto, para a forma clássica, que possui as fases inicial, de estado e final (21;128-130).

A síndrome de infecção assintomática visceral é aquela em que não há manifestações clínicas, encontrada principalmente em pacientes de áreas endêmicas, cujo diagnóstico é realizado por: pesquisa de DNA do parasito, através da reação em cadeia da polimerase (PCR); pela sorologia, que detecta anticorpo antileishmânia no sangue; ou pelo teste intradérmico de Montenegro positivo, que demonstra resposta imune celular ao antígeno de leishmânia. Estudos de coorte mostram que, após soroconversão, a proporção de assintomáticos em relação à doença sintomática varia de 5:1 até 18:1 em diversas populações avaliadas (9;72;131). Apesar da ausência de sintomas, alguns indivíduos têm apresentado a presença de DNA da *L. infantum chagasi* no sangue e a depender da resposta imune desenvolvida, os pacientes assintomáticos podem, assim, permanecer ou evoluir para as formas subclínica ou clássica (8;9;132).

A forma subclínica é caracterizada por sintomas menos intensos ou oligossintomáticos e também está presente nas áreas endêmicas para LV. São decorrentes da presença do parasito nos macrófagos teciduais, nos pulmões, linfonodos, intestino e órgãos hematopoiéticos. Cursa com sintomas que duram de 10 dias a 180 dias e são inespecíficos como febre baixa, tosse improdutiva, diarreia, adinamia e discreta visceromegalia. O mielograma pode se mostrar

positivo ou negativo, mas a hipergamaglobulinemia e elevação do VSH podem chamar a atenção para o quadro. O hemograma e contagem de plaquetas podem se apresentar normais. Esse quadro pode evoluir para a forma clássica em um período 2 a 10 meses ou para a cura, sem tratamento específico, após um período prolongado de aproximadamente 36 meses (131;133).

O período de progressão para o calazar clássico normalmente ocorre dentro de 3 a 14 meses após a infecção, podendo ainda ser tão precoce quanto duas semanas (29;72;134;135). Manifesta-se como uma síndrome, exemplificada pelos pacientes que estão fortemente infectados em todo o sistema mononuclear fagocitário, desenvolvendo posteriormente doença com risco de morte. A sintomatologia mais registrada é a tríade: febre, anemia e hepatoesplenomegalia (129).

O quadro inicia-se com uma fase inicial febril, de instalação geralmente insidiosa, encontrada principalmente em crianças menores (135). A febre persiste contínua ou intermitente, associada à fraqueza, anorexia e perda de peso que progridem por semanas ou meses (136). Seguidamente, instala-se o período de estado, em que de forma geral, o paciente cursa com febre, caquexia, hepatoesplenomegalia (esplenomegalia geralmente predomina), pancitopenia (anemia, trombocitopenia, leucopenia com marcada neutropenia, eosinopenia e relativa linfomonocitose) e hipergamaglobulinemia (principalmente IgG policlonal por ativação de células B) com hipoalbuminemia (129;135-137). Alterações pulmonares ou digestivas podem ocorrer, revelando, respectivamente, acometimento intersticial e enterite causada pela *L. infantum chagasi* e são caracterizadas por tosse seca, dores abdominais e diarreia (138-140).

No período final, soma-se o surgimento de epistaxe, gengivorragia, icterícia, edema, ascite e desnutrição importante (140). Nessa situação, caso o paciente não seja tratado adequadamente a tempo, há risco progressivo de óbito, devido a complicações associadas a infecções ou hemorragias, principalmente quando ele apresenta anemia grave, diarreia e icterícia, consideradas fatores de mau prognóstico (141).

2.7. Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose visceral é complexo, devido às suas características clínicas semelhantes a outras doenças, como malária, febre tifóide e esquistossomose, além de o parasito encontrar-se em tecidos, profundos como baço, medula óssea ou linfonodos, o que dificulta ainda mais esta questão. Todavia, dispomos de um conjunto de exames que nos auxiliam, direta ou indiretamente, na busca de evidência para a atividade da doença. Assim, o diagnóstico laboratorial da leishmaniose pode ser feito pelos seguintes exames: (i) demonstração do parasito em tecidos de relevância, por exame microscópico de luz do espécime corado, em cultura *in vitro* ou inoculação em animais, (ii) detecção do DNA do parasita em amostras de tecido, (iii) detecção do antígeno do parasita, por imunodiagnóstico em tecidos, sangue ou urina, (iv) detecção inespecífica ou específica de anticorpos (imunoglobulinas), ou ainda (v) a busca de células específicas da resposta imune para leishmânia.

A visualização direta da forma amastigota do parasita é o padrão ouro para confirmação diagnóstica, entretanto, requer centro especializado, com profissionais capacitados para coleta e análise microscópica. O aspirado

esplênico é um dos métodos mais valiosos, com sensibilidade superior a 95%, embora esteja associado com o risco de hemorragia fatal em inexperientes mãos e apresenta contraindicações como gravidez, anemia e tendência hemorrágica (17;136;142). Assim, o aspirado de medula óssea torna-se o método mais seguro de detecção direta do parasito, embora, possua menor sensibilidade, que varia de 55 a 77%, e, às vezes, necessite de punções repetidas (142;143). Não obstante, recente estudo mostrou que o aspirado de medula óssea pode apresentar sensibilidade tão elevada quanto o esplênico (96,6% versus 93%), quando as lâminas são analisadas cuidadosamente e por tempo adequado (144). Os linfonodos também podem fornecer material para visualização parasitária, contudo, apesar de possuir menos desconforto e baixo risco de complicações, esse espécime possui sensibilidade que fica em torno de 60% (142).

Cultivos de tecidos contendo leishmânias geralmente são demorados, sendo necessários dias ou semanas, o que dificulta a busca rápida do diagnóstico. Semelhantemente, a inoculação em animais, como hamsters, requer tempo prolongado que varia de 1 a 3 meses, ficando, na maioria das vezes, restrito a trabalhos de pesquisa (142;143).

A imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) são os métodos sorológicos mais amplamente utilizados para pesquisa de anticorpos antileishmânia. Todavia, eles utilizam o parasita inteiro ou extrato do parasito como fonte de antígeno, tornando-os com menor especificidade e com capacidade de possuir reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, hanseníase, tuberculose, esquistossomose e malária (143;145;146). Além do mais, esses métodos dificultam a conclusão

diagnóstica de doença em atividade, pois títulos elevados são observados por meses ou anos, em casos de infecção assintomática ou após o tratamento bem sucedido (12;137;147). Exatamente por possuir alta sensibilidade e detecção de anticorpos persistentes, é que o ELISA, utilizando antígenos de extrato bruto, é utilizado em análises de infecção assintomática em áreas endêmicas para a leishmânia, afastando-se outros agentes causadores de reação cruzada (21;50;128;148-152) .

Durante a LV, causada por membros do complexo *L. donovani*, foi demonstrado que o antígeno recombinante rK39 é específico para a detecção de anticorpos antileishmânia (153). Esse antígeno é altamente sensível com previsão de evocar títulos de anticorpos elevados no início da doença aguda, além de ter um alto valor preditivo para a detecção de LV em pessoas imunodeprimidas, como a AIDS (142). No entanto, esse antígeno não se mostrou útil em casos indianos, onde outros antígenos são atualmente estudados (142;154;155). No Brasil, mostrou especificidade de 90% a 100% e no Rio Grande do Norte, sensibilidade de 94% e especificidade de 99,5%, sendo detectável em apenas 2,7% de indivíduos assintomáticos com teste intradérmico positivo, o que confirma o rK39 como um marcador de doença ativa (156-158). No ano de 2010, o Ministério da Saúde disponibilizou a mesma proteína utilizada em plataformas imunocromatográficas rápidas (DiaMed IT-LEISH®), que permitem execução simples e interpretação visual das reações. O teste já foi validado para o diagnóstico da leishmaniose visceral em quatro áreas endêmicas do Brasil, revelando sensibilidade de 93% e especificidade de 97% (159) e parece ser promissor, principalmente nas regiões mais carentes de recursos em saúde.

Apesar de diferentes métodos moleculares terem sido sucessivamente avaliados para o diagnóstico da leishmaniose, ensaios baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), atualmente, constituem a principal abordagem de diagnóstico molecular de pesquisadores e profissionais de saúde, sendo um dos métodos mais sensíveis em pacientes HIV, além de servirem como marcador para risco de recidiva pós cura clínica (37;160;161). Embora esses métodos mostrem considerável sensibilidade (detecção de somente 50-100 parasitas), o seu uso potencial no diagnóstico de rotina é dificultado pelo complexo processo de realização, fazendo com que essas técnicas continuem restritas a hospitais de referência ou centros de investigação (161). Diversas amostras podem ser utilizadas na PCR, como sangue periférico (162-165), linfonodos (160), creme leucocitário (164) e medula óssea (160;166), na qual 100% das amostras se mostram positivas. Como último avanço, entre as modernas técnicas lançadas, a PCR em tempo real é capaz, além de quantificar o DNA, de identificar a espécie de leishmânia, destacando-se pela maior velocidade do resultado e pela possibilidade de avaliação da resposta terapêutica (167;168).

. Avaliações buscando a detecção de antígenos são testes mais específicos do que aqueles baseados em presença de anticorpos, possuem baixa reatividade cruzada e podem distinguir infecções ativas de passadas (37;143). Dependendo do método e antígeno utilizado, a detecção de antígenos mostrou elevadas especificidades de até 100%, mas com sensibilidades variadas (48-96%), além de não serem detectáveis dentro de três semanas após tratamento, sugerindo que o teste tem grande valor

prognóstico (37;169-171). Contudo, ainda são necessários estudos futuros para avaliar sua utilidade para o diagnóstico e prognóstico de LV.

2.8. Intradermorreação de Montenegro

Hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) ou imunidade mediada por células T é um grupo de resposta imune específica. Testes de DTH são amplamente utilizados como método de triagem para a identificação de pessoas com resposta imune positiva contra *M. tuberculosis*, em que recente meta-análise indicou uma sensibilidade global de 77 % para a tuberculose ativa (172;173). A intradermorreação de Montenegro (teste cutâneo de Montenegro) é um teste de DTH específico para a leishmaniose introduzido em 1926 por Montenegro como uma ferramenta de diagnóstico para a leishmaniose cutânea e mucocutânea e foi usado, pela primeira vez, em áreas endêmicas de LV no Quênia, no ano de 1959 (24). Classicamente é utilizado em estudos epidemiológicos para a detecção de exposição à leishmânia, caracterizada como infecções subclínicas ou assintomáticas (18-22;143;145).

Indivíduos com forma subclínica de LV, conforme análises em populações de áreas endêmicas, mostram uma forte resposta proliferativa celular e teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardia positivo, além de produzirem maiores níveis de IFN- γ do que aqueles que evoluíram para doença (7;8). Nos casos agudos de LV, o teste mostra-se negativo, devido à ausência da resposta de hipersensibilidade tardia, tornando-se posteriormente positivo, nos casos curados, em torno de um ano após o tratamento específico, o que o caracteriza como um indicador de prognóstico pós tratamento (143;145;147;174), além de ter se mostrado como um marcador para o desenvolvimento de resistência adquirida à doença (9). Portanto, a reação

positiva ao DTH constitui-se um marcador fenotípico, com provável controle genético, pois é encontrada em agrupamentos familiares (10) e relacionada com genes *LECT2* e *TGFBI*, associados com a capacidade de montar uma resposta imune adquirida para infecção por *L. infantum chagasi* (175).

Todavia, há ainda a necessidade da produção de reagentes seguros, eficazes e padronizados em âmbito mundial, já que o antígeno é obtido de diferentes formas com várias concentrações e diluentes (176). Na Índia, por exemplo, o teste cutâneo para avaliação de DTH revelou baixa sensibilidade em pacientes curados de LV, quando utilizado antígenos de espécies de leishmânia diferentes da *L. donovani*, causadora de LV naquele país, mostrando a necessidade de padronização local, caso contrário há dificuldade de avaliação de exposição prévia com esse exame (28).

No Brasil, estudos foram concebidos para analisar as respostas do teste cutâneo a antígenos de leishmânia na leishmaniose visceral americana (LVA) (177;178). Verificou-se que, após a recuperação clínica, os pacientes tiveram reações de hipersensibilidade tardia positiva a promastigotas de *L. infantum chagasi* em até 95%-100% dos indivíduos, não produzindo respostas positivas em controles saudáveis, pacientes com tuberculose, ou portadores de esquistossomose, e baixas respostas positivas (<5%) nas pessoas com doença de Chagas, além de que extratos solúveis de antígenos de *L. infantum chagasi* podem ser estáveis em suas preparações e são raramente perdidos com o passar do tempo. Posteriormente, esses testes cutâneos de Montenegro foram feitos em populações selecionadas. Na cidade de Jacobina-BA, 89% dos pacientes com LV confirmada desenvolveram Montenegro positivo quando testadas de 1 a 6 anos após tratamento (128). Em Natal, numa área endêmica

da *L. infantum chagasi*, foi observado desenvolvimento de Montenegro positivo de 8 meses a 3 anos após tratamento com sucesso (21). No Ceará, uma coorte encontrou que 76% dos indivíduos que se tornaram anticorpos positivos foram também reagentes ao teste de Montenegro, e 86% das pessoas que foram confirmadas como portadoras da leishmaniose visceral tornaram-se DTH+ após tratamento (179). Desta maneira, em nosso país, um teste Montenegro positivo, na ausência de história de LV, é considerado como evidência de infecção passada por *L. infantum chagasi* assintomática ou autorresolução.

Estudos realizados em áreas endêmicas para leishmânia mostraram claramente que a evolução da infecção por este microorganismo é espectral, com características de susceptibilidade e resistência a desenvolver formas graves da doença. Essas categorias fenotípicas são críticas para análise imunogenética de infecção. Estudos longitudinais sugerem que pode haver um subconjunto de pessoas com infecção assintomática que aparentemente não desenvolvem teste cutâneo positivo ou não mantiveram uma resposta DTH duradoura, tornando-se negativos ao longo do tempo (9;24). A existência desses grupos precisa ser definida, pois desta forma uma quantidade maior de infectados previamente estão sendo classificados inadequadamente como não expostos e podem subestimar um contingente maior de indivíduos que foram expostos à leishmânia.

Os dados disponíveis até então não determinam se as pessoas infectadas e que apresentam um teste de Montenegro negativo, inicialmente, desenvolveram e, posteriormente, negativaram a resposta DTH com a eliminação do parasita, ou se eles, primeiramente, não conseguiram desenvolver resposta. Da mesma forma, não sabemos se a resposta DTH

positiva se mantem duradoura, se é um marcador de controle da infecção por *L. infantum chagasi*, quais são os fatores relacionados com a perda ou manutenção dessa resposta ao longo do tempo e quais as citocinas e quimiocinas envolvidas nessas condições.

Presume-se que a infecção assintomática com *L. infantum chagasi* resulte em um estado de resistência ao desenvolvimento de LV, e a persistência do DTH positiva pode ser devido à exposição continua para *L. chagasi*, mas faltam dados na literatura que apontem nesse sentido. Também supõe-se que este estado de resistência, marcado por uma resposta DTH positiva, é mantida ao longo da vida em indivíduos que não se tornam imunocomprometidos (9;180). No entanto, evidências referentes a esses pressupostos estão faltando, inspirando-nos a embarcar em um cuidadoso exame dos indivíduos assintomáticos e com passado de leishmaniose visceral com "presumido estado imune". Como tal, pareceu justificado examinar-se a duração e a estabilidade do estado de infecção assintomática, definida por uma resposta imune detectada por um teste de Montenegro positivo, bem como a duração e a estabilidade do estado de "resistência" pós-calazar, em uma população exposta constantemente.

3. MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Para alcançarem-se os objetivos 1 e 2, foi realizado estudo prospectivo do tipo coorte, com uma amostra retirada de um universo presente em estudo iniciado em 1996 e que tinha como objetivo a compreensão dos determinantes envolvidos na evolução diante da infecção por *L. infantum chagasi* (21). Neste estudo inicial, foram inclusos os residentes de áreas caracterizadas por transmissão de infecção por *L. infantum chagasi* e endêmica para leishmaniose visceral.

Para o alcance do o objetivo 3, simultaneamente, realizou-se estudo caso-controle aninhado utilizando indivíduos que perderam a resposta DTH para antígenos de leishmania com o passar do tempo, mantenedores das respostas DTH (positiva ou negativa) e aqueles que possuíam passado de leishmaniose visceral.

3.2. Local do estudo

O estudo foi realizado em cidades do estado do Rio Grande do Norte e englobou a capital Natal, além de alguns municípios da região perimetropolitana, a saber: Macaíba, Parnamirim, São Gonçalo do Amarante, Nísia Floresta, São José de Mipibú, Extremoz, Maxaranguape, Touros, Ielmo Marinho e Ceará-Mirim (figura 5). Esses municípios possuíam transmissão da infecção por *L. infantum chagasi* com notificação pregressa de casos de LV.

Na capital, foram inclusos os seguintes bairros: Loteamento Boa Esperança, Lagoa Azul, Nova República, Pajuçara, Redinha, Vale Dourado e Potengi na região Norte, além do Planalto na região Oeste.

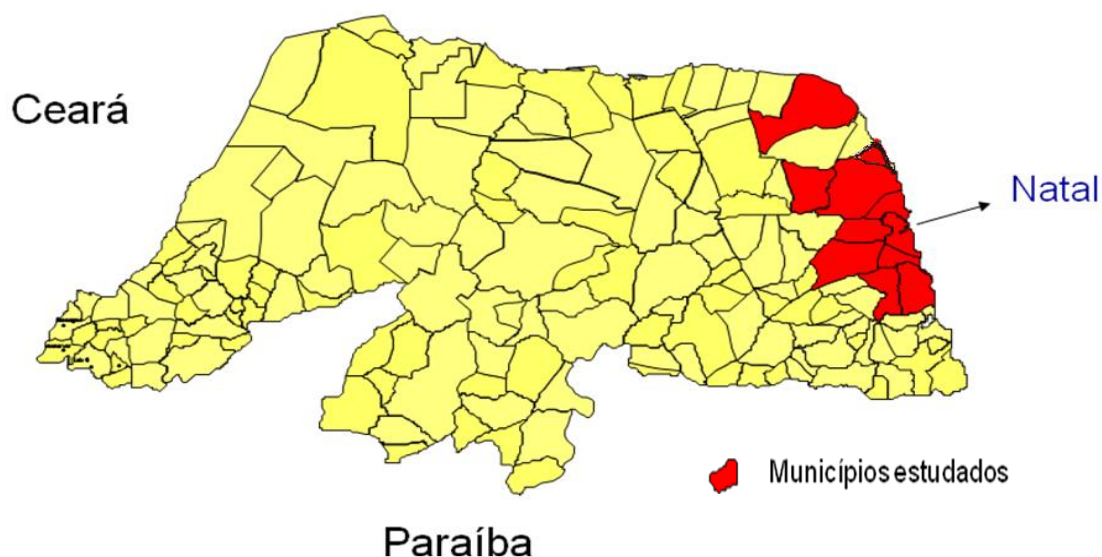


Figura 5. Local do estudo

3.3. População Estudada

3.3.1. Identificação dos indivíduos da coorte

3.3.1.1. Critérios de Inclusão: Os sujeitos oriundos do estudo familiar que possuíam resultado anterior do teste de Montenegro e análise sorológica para presença de anticorpos antileishmania, residentes nas áreas atualmente caracterizadas por transmissão de infecção por *L. infantum chagasi*.

3.3.1.2. Critérios de Exclusão: Indivíduos com história atual de LV, passado ou presente de leishmaniose cutânea, doença de Chagas ou ainda aqueles que não quiseram realizar coleta de sangue ou o teste de Montenegro.

3.3.2. Identificação dos indivíduos do estudo caso controle aninhado.

Os indivíduos identificados, cujo DTH mostrou alteração (DTH + para DTH-) durante o seguimento das visitas, tiveram coletada uma alíquota de sangue adicional para estudos imunológicos. Uma vez identificado o caso, o próximo indivíduo mantenedor da resposta DTH +, bem como o mantenedor de

DTH – ou aquele com passado de leishmaniose visceral foram selecionados como controles pareados.

3.4. Coleta de dados epidemiológicos e amostra sanguínea da coorte

Após a seleção dos participantes, que preencheram os critérios de inclusão, foi lido o termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice 2). Para os indivíduos selecionados no estudo e que assinaram o termo de consentimento, foram aplicados os questionários individuais padronizados (apêndice 1). As coletas dos dados foram feitas exclusivamente pelo autor do projeto.

As variáveis estudadas foram divididas em: 1) demográficas: sexo, idade, tempo de moradia, mudança de domicílio, número de pessoas residentes no domicílio; 2) resposta imune recente à coinfeção por outros agentes nos últimos 15 dias, caracterizada pela presença de febre, perda de peso, anorexia, tosse, dor muscular, diarreia, outros sintomas infecciosos, além de diagnóstico médico de infecção recente; 3) comorbidades: hipertensão arterial sistêmica, insuficiência cardíaca congestiva, diabetes, tuberculose, hipotireoidismo, gravidez, AIDS, hanseníase, helmintíases, desnutrição, neoplasia, doença reumática e/ou uso de medicações imunossupressoras; 4) exposições recentes a antígenos em vacinações pregressas: sarampo, poliomielite, febre amarela, tétano, hepatite B, rubéola, influenza e BCG; 5) risco de exposição ao flebotomíneo: tipo de moradia, residência próxima à área de vegetação e presença de animais no peridomicílio; 6) presença de reservatórios (humano e canino) e vetores para *L. infantum chagasi* na localidade.

Todos os participantes foram submetidos à avaliação nutricional de peso e altura para aferição do Índice de Massa Corporal (IMC) (181;182). As medidas de peso e altura foram obtidas por aparelhos padronizados e mensuradas por um pesquisador treinado. Uma balança digital de pesagem, com precisão de 100 gramas e uma capacidade de 150 kg (Plenna, São Paulo, Brasil) foi utilizada para medir o peso. A altura foi medida com um antropômetro portátil (Invicta Education, Leicester, United Kingdom) com uma precisão de 0,1 cm. Nas crianças e adolescentes menores de 15 anos, peso para a idade, estatura para idade, relação peso/altura e escores z, para índice de massa corporal, foram calculados utilizando-se Epi-Info software, versão 3.4.1 (Atlanta, GA-2000-Centers for Disease Control and Prevention).

Para os maiores de 16 anos de idade, também foram mensuradas as dobras cutâneas para efetuar a avaliação da composição corporal (calcula a massa de gordura corporal) (183) por meio de adipômetro (Lange Skinfold Caliper, Beta Technology, EUA), além das medidas de circunferência abdominal e da relação cintura-quadril por meio de fita métrica com precisão de 0,1cm.

Os indivíduos com sintomas clínicos foram submetidos a exame físico para avaliação diagnóstica de quaisquer outras comorbidades que pudessem interferir na resposta imune. Os indivíduos com problemas de saúde encontrados foram referenciados aos centros de saúde para tratamento adequado ou, quando possível, foram resolvidos pela equipe de campo. Os indivíduos receberam os resultados dos exames laboratoriais, de hemograma com contagem de plaquetas, durante a visita para leitura do DTH. Todos os

dados clínicos foram registrados no questionário, incluindo o estado de saúde atual.

Finalizando a visita, foram coletados 10 ml de sangue em veia periférica e estocados em tubos Vacutainer® secos e com EDTA para a avaliação laboratorial dos anticorpos antileishmânia e realização de hemograma com contagem de plaquetas, respectivamente. Os soros foram obtidos após coagulação em temperatura ambiente, posteriormente armazenados em tubos Eppendorfs® e congelados a -20° C até a realização do teste.

3.5. Amostra sanguínea para avaliação imune do estudo caso- controle

Para essa avaliação, foram coletados adicionalmente 15 ml de sangue em veia periférica e estocados em tubos BD Vacutainer® Plus com Heparina de Sódio para posterior mensuração das citocinas e quimiocinas, conforme explicitado adiante.

3.6. Definição de infecção por Leishmania

3.6.1. Diagnóstico de infecção por Leishmania utilizando extrato solúvel de antígenos, obtidos de promastigotas de *Leishmania chagasi* (SLA)

A presença de anticorpos antileishmânia no soro dos indivíduos foi realizada por ELISA, utilizando antígenos solúveis de *L. infantum chagasi* (184). Os antígenos foram diluídos em tampão carbonato (15mM) bicarbonato (28mM) pH 9,6, sendo aplicados à microplaca (Falcon Probind, cat. n^o 3915) e

incubados por 18 horas, a 4°C. Após a incubação, o excesso de antígeno foi removido por lavagem, e o tampão de bloqueio (PBS/Tween20 1%) foi adicionado e mantido por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada 4 vezes com PBS/Tween20 0,1% e os soros dos pacientes e dos controles negativos, diluídos em PBS, foram aplicados nas diluições de 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:10000, sendo incubados por 1 hora, à temperatura ambiente. Subsequentemente, procedeu-se à remoção do soro e à lavagem dos poços, conforme descrito anteriormente. Após essa etapa, o anticorpo secundário (conjugado anti-IgG-peroxidase, diluído 1:4000) foi adicionado e incubado por 1 hora. O excesso de anticorpo secundário foi, então, desprezado, e a placa foi novamente lavada, nas mesmas condições anteriores, para aplicação do substrato (peróxido de hidrogênio), na presença do cromógeno (ABTS, 0,001 mM) diluído em tampão citrato (29,3 mM)-fosfato (41,1 mM, pH 4.2). A reação permaneceu à temperatura ambiente por 1 hora, quando foi interrompida pela adição de SDS 5%. A intensidade da cor desenvolvida é proporcional à quantidade de anticorpo presente na amostra. A densidade óptica foi lida a 405nm (Titerteck Instruments, Inc., Huntsville, AL, EUA), com posterior estabelecimento de um ponto de corte, que corresponde à média das absorvâncias dos soros controles negativos na diluição 1:500 e 1:100 mais três desvios padrões.

3.6.2. Diagnóstico de infecção por leishmânia utilizando o teste de hipersensibilidade tardia-DTH (teste de Montenegro)

Para avaliar a imunidade celular específica, foi realizado o teste de Montenegro (DTH), utilizando-se antígeno de leishmânia produzido pelo Centro de Produtos e Biológicos (CPPI, Curitiba/PR). Cada frasco ampola com 1 ml contém suspensão de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (cepa de referência OMS MHOM/BR/73/PH8), na concentração de 40µg/ml de nitrogênio proteico.

O frasco foi agitado por 30 vezes antes de usado, retirado o lacre central, feita a assepsia da parte exposta da rolha com solução anti-séptica (álcool a 70%), perfurando a rolha com agulha de insulina e retirando-se 0,1 ml do antígeno.

Após a preparação da seringa, procedeu-se à assepsia da pele do paciente, no local da aplicação, com solução antisséptica, onde foi injetado 0,1ml do antígeno via intradérmica na face anterior do antebraço, 2 a 3 cm abaixo da dobra do cotovelo (dobra antecubital), e observada a elevação ou pápula de ± 1 cm ocorrida no momento da inoculação, no local da aplicação. A aplicação foi realizada logo depois de retirado o antígeno do frasco, evitando que a suspensão sedimentasse no frasco e/ou na parede da seringa.

O teste foi realizado pelo autor da tese (Hênio Lacerda), bem como a leitura, que foi efetivada entre 48 a 72 horas após a inoculação, utilizando-se a técnica da caneta esferográfica para medir a endureção (140). Nessa técnica, é exercida pressão moderada, traçando lentamente uma linha com uma caneta a partir de um ponto exterior, que dista 1 a 2 cm da área de

inoculação, até encontrar resistência. Quando encontrada resistência, foi levantada a caneta da pele e observado o ponto (cacifo) indicando um dos limites da endureção que foi medida. Repetiu-se a mesma operação no lado oposto da endureção. Desta forma, permitiu-se visualizar as bordas da endureção ou pápula, cujo diâmetro pôde-se determinar medindo a distância entre as linhas opostas.

A reação foi considerada negativa quando houve ausência de qualquer sinal no ponto de inoculação ou presença de uma pápula ou nódulo com menos de 5 mm de diâmetro. Reação positiva foi considerada na presença de uma pápula ou nódulo, igual ou superior a 5 mm ou ulceração.

O teste foi realizado com no mínimo um ano do anterior, para evitar o efeito “booster”, em que a repetição de testes em curto espaço de tempo pode amplificar as reações subseqüentes, transformando em reatores fortes os indivíduos inicialmente pouco reatogênicos..

3.7. Determinação de citocinas e quimiocinas

Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), oriundas do sangue venoso heparinizado, de indivíduos do estudo caso-controle, foram purificadas e conservadas com estimulação com antígenos de *L. infantum chagasi* para determinar o perfil das citocinas e quimiocinas quanto ao respectivo grupo estudado. Nesse ensaio, foram transferidos 10 ml de sangue heparinizado (~160µl Heparina/10ml de sangue) para um tubo cônico de 50 mL e adicionada igual volume de solução salina estéril, sendo então homogeneizado. A essa solução, foram adicionados, com cuidado, 10 ml do reagente Ficoll-Paque na parte inferior da mistura e centrifugado a 1600 rpm

por 30 minutos em temperatura ambiente. Foi em seguida removida suavemente a camada mononuclear com uma pipeta de 10 ml, transferindo-a para um tubo cônico de 50 ml e adicionado solução salina para preencher o tubo. Posteriormente, foi centrifugada a 4°C, em 1400 rpm por 13 minutos, sendo então desprezado o sobrenadante e homogeneizado com o vórtex suavemente, repetindo-se essa etapa por mais 2 vezes. A camada mononuclear obtida foi diluída na proporção de 20µl:400µl de células:salina e contada na câmara de Neubauer, sendo calculado o volume para 1.0×10^7 cells/ml. Na placa de 96 poços, foram colocados, por poço, 140 µL de RPMI suplementado (10% soro AB negativo e 100µg/mL streptomina/gentamicina), 40µL das células, 20 µL de SLA a 100µg/ml (no poço ficou 10 µg/ml) e incubados a 37 °C, com 5% de CO₂ para 72hs. Após esse tempo, foi aspirado o sobrenadante de cada poço e armazenado a -80°C em tubos Eppendorf®, antes da realização do experimento.

A detecção e quantificação das diferentes citocinas (IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, TNF-α e IFN-γ) e quimiocinas (CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10) foram obtidas por ensaio comercial multiplex (Luminex® Extracellular Assay Protocol, Invitrogen Corporation) realizado no laboratório do Departamento de Medicina Interna, Microbiologia e Epidemiologia da Universidade de Iowa, na cidade de Iowa, EUA. A tecnologia Luminex é uma matriz de citometria projetada para realizar simultaneamente várias análises, usando contagens espectralmente distintas em um único poço de uma microplaca, utilizando-se volumes de amostra muito pequena (isto é, tão pouco como 25 microlitros) e já utilizada na análise de secreção citocinas e quimiocinas induzidas por amastigotas de leishmânia (185;186).

Por essa tecnologia, anticorpos monoclonais específicos para as citocinas e quimiocinas estudadas são acoplados a microesferas (Invitrogen catalog, em www.invitrogen.com/luminex). Igual número de conjuntos de microesferas acopladas é combinado para cada ensaio. Após a introdução do sobrenadante, contendo as interleucinas, elas se acoplam aos anticorpos monoclonais anti-interleucinas específicos. Seguidamente, são colocados anticorpos de detecção biotinilados (acoplados com Biotina) e, finalizando a reação, é adicionado um conjugado de estreptavidina com R-ficoeritrina (SAV-RPE), em que a estreptavidina é uma proteína purificada a partir do *Streptomyces avidini*, que possui uma afinidade extremamente alta pela biotina, e a R-ficoeritrina é uma proteína fluorescente, pertence à família ficobiliproteínas, uma família de proteínas altamente solúveis e fluorescentes derivados de cianobactérias e algas eucarióticas. Dessa forma, ao final da reação, níveis de citocinas nos soros dos pacientes são quantificados, com este procedimento de imunoensaio, pela medição da fluorescência em uma estação BioPlex (Bio -Rad Laboratories, Hercules , CA).

3.8. Análises clínicas e sorológicas caninas para detecção de potenciais reservatórios de leishmanias

Foram realizadas avaliações clínicas, exame físico e sorologias para detecção de reservatórios caninos nos domicílios dos entrevistados, escolhidos aleatoriamente, em 26 (63,4%) dos 41 bairros estudados. As análises caninas e coletas de sangue dos animais foram realizadas exclusivamente pela médica veterinária Paula Viviane Queiroz, como parte de sua tese de doutorado. Sinais e sintomas sugestivos de calazar canino foram investigados em questionário

padrão (anexo 1) com posterior exame físico. Por fim, foi realizada coleta de amostra sanguínea para diagnóstico de infecção por leishmânia utilizando extrato solúvel de antígenos, obtidos de promastigotas de *Leishmania chagasi* (SLA), em protocolo semelhante ao realizado para investigação humana supracitado.

3.9. Armazenamento dos dados

Os questionários foram armazenados para cada indivíduo no programa Microsoft Access®, que é um programa responsável pelo armazenamento de dados em forma estruturada utilizando uma linguagem específica SQL (Structured Query Language), padronizada pela ANSI (American National Standard Institute) para banco de dados. Os participantes foram identificados por um Número de Identificação do Paciente (PID), gerado quando ele entrou no estudo e por um Número de Identificação no Estudo (SID).

3.10. Análise dos dados e tamanho de amostra

Os participantes do estudo foram seguidamente avaliados quanto à resposta imune (DTH e sorologia), em relação à primeira visita, realizada em estudo familiar, conforme mencionado. Esses dados serviram para verificar os parâmetros epidemiológicos envolvidos com a resposta DTH, como também suas influências na mudança dessa resposta e dos títulos de anticorpos ao longo do tempo e se o padrão responsivo corresponde aos determinantes imunológicos do perfil Th1/Th2.

Para determinar a história natural e os mecanismos envolvidos na manutenção da resposta a antígenos de leishmânia, o ponto final (“Endpoint”) foi a aquisição dos dados das variáveis estudadas com a resposta DTH nas

visitas sequenciais realizadas. De outra forma, para determinar se a manutenção ou perda do DTH está associada com citocinas e quimiocinas do tipo Th1 e/ou Th2, o “Endpoint” foi a aquisição dos dados individuais das respectivas mensurações entre os fenótipos distintos.

Com base em dados clínicos, sorológicos e imunológicos, a população estudada, na primeira e segunda visita, foi caracterizada em quatro fenótipos, a saber:

1. **LV**: Paciente com história pregressa de LV.
2. **.DTH+**: Indivíduo que apresentou autorresolução da infecção, detectado por positividade ao teste de hipersensibilidade tardia a antígenos de leishmânia, sem história de tratamento para leishmaniose.
3. **Ac+** (DTH-/Anticorpo +): Indivíduo com teste de hipersensibilidade tardia a antígenos de leishmania negativo e sorologia positiva (presença de anticorpo antileishmânia no soro). Este grupo de indivíduos provavelmente teve infecção recente podendo evoluir para qualquer um dos fenótipos indicados (21;72).
4. **DTH-** (DTH-/Anticorpo-): Indivíduo residente na área endêmica para LV, sem sinais de infecção.

Para as investigações de fatores epidemiológicos ambientais e individuais envolvidos na resposta celular humana, análises univariadas foram realizadas em casos e controles estratificados de acordo com exposição à *L.infantum chagasi*, conforme resposta DTH da visita de seguimento. No estudo de coorte, fatores relacionados com a resposta DTH foram avaliados, e testes estatísticos foram realizados no subgrupo dos indivíduos nos quais o status do DTH modificou-se e nos indivíduos controles.

Na análise de citocinas e quimiocinas, correspondentes aos respectivos padrões de resposta Th1/Th2, foram comparados valores quantitativos observados em duas análises. A primeira análise levou em conta o valor das citocinas e quimiocinas nos pacientes com DTH positivo ou negativo. Na segunda análise, esse valores foram comparados nos grupos compostos por grupo estudo (DTH + que perderam suas respostas) e grupos controles (DTH + e DTH – que mantiverem o padrão de resposta e LV), de acordo com o status do DTH ao longo do tempo ou com passado de leishmaniose visceral.

As informações do estudo de coorte foram analisadas utilizando-se o banco de dados do programa SPSS[®] (Statistical Package for the Social Sciences) versão 11.5 para Windows. O intervalo de confiança foi de 95% (1-alfa) e o poder de 80% (1-beta). No estudo caso-controle, comparações estatísticas foram realizadas com o auxílio de GraphPad Prism versão 4.01 para Windows (Graph-Pad Software, San Diego, CA).

Para caracterização da amostra, nos diferentes fenótipos encontrados, foram efetuadas análises das variáveis quantitativas utilizando-se média e erro padrão (EP). No cálculo dos valores para SLA, por serem realizados em dois momentos e possuírem “cut offs” diferentes, utilizou-se análise logarítmica da razão entre o valor encontrado e o valor “cut off” usado nos experimentos.

No estudo de coorte, para a associação de variáveis dicotômicas e o resultado do teste de Montenegro (positivo ou negativo) usaram-se os testes de qui-quadrado e o exato de Fisher, que determinaram as diferenças estatisticamente significativas entre as proporções de dados que não possuem distribuição normal. O qui-quadrado é um valor da dispersão para duas variáveis de escala nominal. Ele nos diz em que medida os valores observados

se desviam do valor esperado, caso as duas variáveis não estivessem correlacionadas. Quanto maior o chi-quadrado, mais significativa é a relação entre a variável dependente e a variável independente. O teste exato de Fisher é basicamente um qui-quadrado, usado na análise de dados categoriais em que as amostras são pequenas (com 20 dados ou menos).

Na associação de variáveis quantitativas com o resultado do teste de Montenegro, foi usado o teste de ANOVA (análise de variância) a fim de determinar diferenças estatisticamente significativas entre médias de dados com distribuição normal e os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para os dados que não possuem distribuição normal. A análise de variância visa fundamentalmente verificar se existe uma diferença significativa entre as médias, e se os fatores exercem influência na variável dependente. O teste de Mann-Whitney avalia se duas amostras (observações) independentes, que não possuem distribuição normal, são igualmente elevados, enquanto que o Kruskal-Wallis é usado para comparar três ou mais grupos de dados da amostra.

O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para a verificação da medida de associação entre variáveis contínuas e mensuração do teste de Montenegro em milímetros. O sinal da correlação de Spearman indica a direção da associação entre X (variável independente) e Y (variável dependente). Se Y tende a aumentar quando X aumenta, a correlação de Spearman é positiva. Se Y tende a diminuir quando X aumenta, a correlação de Spearman é negativa. A correlação de Spearman de zero indica que não há tendência de Y aumentar ou diminuir, quando X aumenta.

Para análise da variação DTH nos dois momentos, em função dos fatores epidemiológicos estudados, foram ajustados *modelos de regressão logística com resposta multinomial*, ou seja, a resposta indica a variação ocorrida no status DTH, no estudo coorte entre os dois momentos de avaliação. O DTH é classificado nas seguintes categorias: Positivo – DTH manteve-se positivo; Positivaram – DTH mudou de negativo para positivo; Negativo – DTH manteve-se negativo; e Negativaram – DTH mudou de positivo para negativo. Como variáveis independentes ou explicativas, foram considerados os fatores epidemiológicos ambientais e individuais estudados.

Em geral, quando se usa regressão logística multinomial, escolhe-se uma das categorias da variável resposta como categoria de comparação, frequentemente a última, e obtêm-se *razões de risco relativo* (exponenciais dos coeficientes β_j) separadamente para cada uma das demais categorias em função dos níveis de cada variável explicativa. Então, $Exp(\beta_j)$ representa a mudança na *odds*: de estando na categoria j da variável dependente *versus* a categoria de comparação, associada com um incremento sobre a variável independente.

Modelo: Para uma amostra de n indivíduos com variável resposta Y com J categorias e L variáveis explicativas X , então o log da razão da probabilidade do indivíduo i ser classificado como Y_i e como Y_L é dado pela fórmula

$$\text{logit}(p_{ij}) = \log\left(\frac{p_{ij}}{p_{iL}}\right) = \beta_{0j} + \sum_{l=1}^L \beta_{lj} x_{il} + \text{error}_i,$$

onde x_{il} é o valor assumido pelo indivíduo i em relação à variável l .

No estudo caso-controle, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para análise da associação de dados que não possuem distribuição normal dos

níveis de citocinas e quimiocinas entre grupos estudados. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

O tamanho amostral da coorte foi baseado em uma análise piloto, em que havia a estimativa da manutenção de resposta DTH em 66% entre os expostos e em 50% entre os não expostos. São, portanto, necessários, 320 indivíduos para detectar um risco relativo de 1.32 para fatores de exposição com um intervalo de confiança de 95% (1-alfa) e o poder de 80% (1-beta). Desta forma, esperar-se-ia que aproximadamente 10% dos indivíduos modificassem seus padrões de DTH durante o período de seguimento do estudo. Baseada nesse cálculo, a amostra da coorte foi composta de 331 indivíduos e oriunda do estudo familiar anteriormente realizado com 1.106 participantes (figura 6) (21), dos quais 135 (12%) tinham LV anterior ou no momento do estudo, 390 (35%) possuíam infecção assintomática com autorresolução, e 21 (1,9%) apresentavam evidência de infecção assintomática recente (tabela 1).

Tabela 1. Número de famílias e indivíduos de acordo com a evolução diante à infecção por leishmânia. Adaptado de Jerônimo, S.M.B. *et al. Scand J Infect Dis* 36: 443-449, 2004.

| Grupo familiares ^a | Número de famílias ^b | Indivíduos e fenótipos | | | | Total |
|-------------------------------|---------------------------------|------------------------|------|-----|------|-------|
| | | LV | DTH+ | Ac+ | DTH- | |
| 1 | 35 | 3 | 57 | 0 | 87 | 147 |
| 2 (LV) | 124 | 132 | 239 | 7 | 249 | 627 |
| 2 (não-LV) | 57 | 0 | 94 | 14 | 224 | 332 |
| Total | 216 | 135 | 390 | 21 | 560 | 1106 |

^a Amostra 1: selecionados randomicamente em um único bairro endêmico; Amostra 2 LV:

famílias com casos de LV hospitalizados; Amostra 2 não LV: vizinhos próximos de famílias LV

que tinham crianças. ^b Estes valores representam o número de famílias para quem a

informação foi suficientemente obtida para determinar um fenótipo.

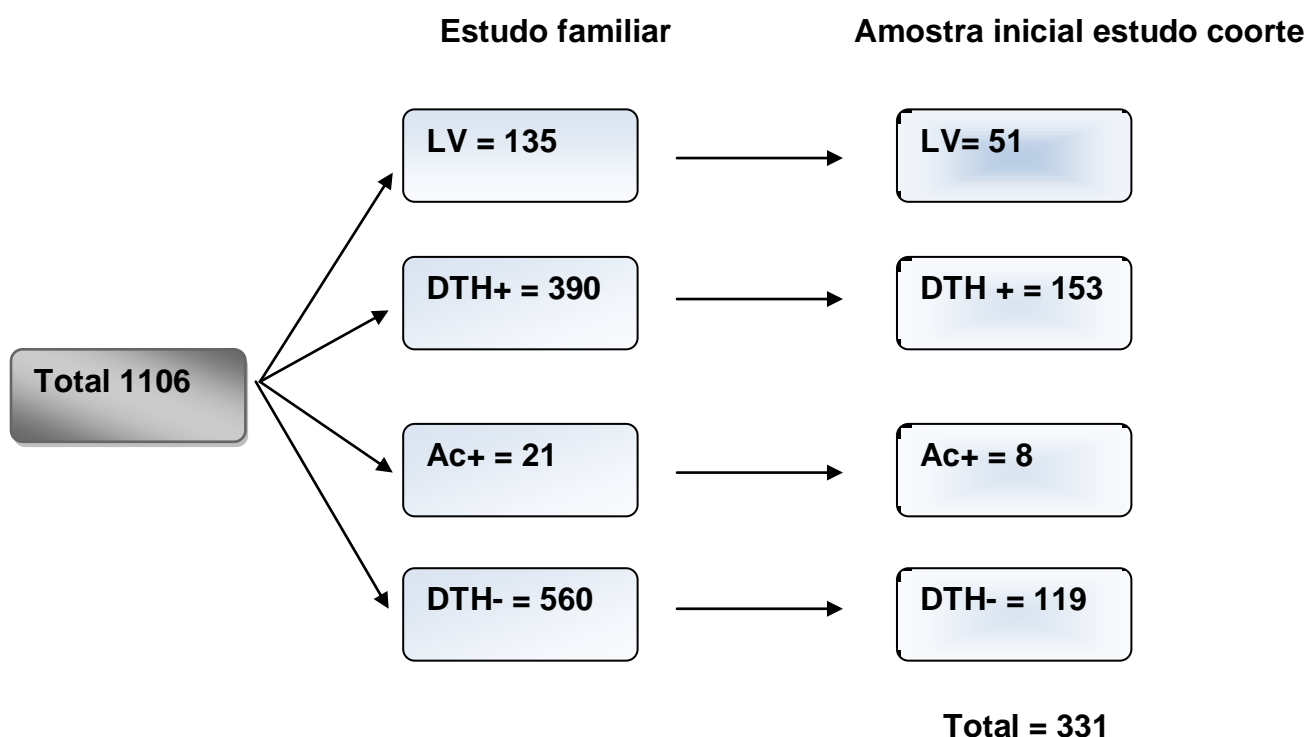


Figura 6. Fluxograma da amostra constituída no estudo de coorte a partir de estudo familiar anteriormente realizado

Para o estudo caso-controle do perfil imune, relacionados com a resposta DTH, foi selecionado, entre os 331 indivíduos arrolados da coorte, um mínimo de 10 indivíduos de cada um dos quatro grupos anteriormente mencionados. Assim, a amostra ficou composta de quatro grupos com 16 indivíduos apresentando passado de LV, 11 com manutenção da resposta DTH (DTH+/+), 10 com perda da resposta DTH (DTH+/-) e 16 com ausência de infecção para leishmânia (DTH-).

3.11. Considerações éticas

Todos os detalhes do protocolo foram cuidadosamente discutidos com todos os sujeitos, que foram convidados a participar do estudo. O termo de

consentimento livre e esclarecido foi utilizado (anexo 2), ou seja, os pacientes foram questionados se consentiam em participar de ambos os estudos. Os indivíduos (ou familiares ou guardiões legais dos sujeitos menores de 18 anos de idade) foram convidados a ler ou, nos casos de analfabetos, a ouvirem a leitura do termo de consentimento e a assinar o consentimento informado aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEP-UFRN) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Cada sujeito teve a oportunidade de questionar suas dúvidas sobre o estudo, e só fizeram parte do estudo aqueles que assinaram o termo de consentimento pós-informação.

Todas as informações dos pacientes e de suas famílias foram mantidas sob sigilo e são acessíveis apenas à equipe do projeto. Em linhas gerais, foram coletados dados epidemiológicos através de entrevistas dos indivíduos ou dos responsáveis, quando se tratou de crianças ou de pessoas inabilitadas. Esses dados foram armazenados em fichas e em bancos de dados mantidos no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Bioquímica da UFRN.

4. RESULTADOS

4.1. Características demográficas da população estudada

Foram analisados 331 indivíduos, que preenchem critérios de inclusão. O percentual dos indivíduos, de acordo com o município de residência, foi distribuído conforme figura 7.

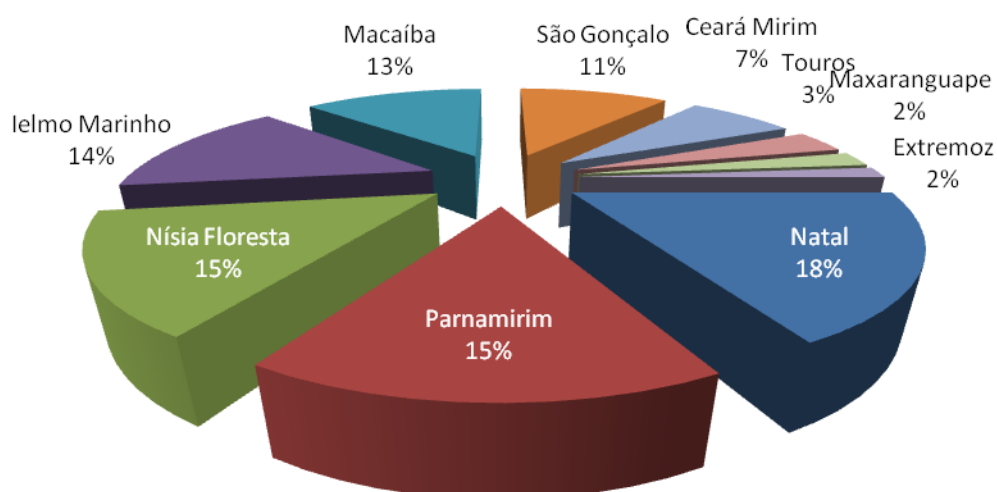


Figura 7. Distribuição percentual dos participantes de acordo com o município de residência

Quanto ao sexo, houve predominância do feminino com N=191 (57,7%) e masculino N= 140 (42,3%). A idade mediana dos participantes foi de 20 anos (IQR=12-41). A idade mínima foi de 4 anos e máxima de 89 anos, sendo que 73 % dos indivíduos tinham menos de 40 anos. A distribuição por faixa etária em quinquênios apresentou-se conforme figura 8. Duzentos e setenta e quatro (82,8%) pessoas não tinham mudado de endereço entre a primeira e segunda

visita da coorte. O número de residentes por domicílio variou de 1 a 14 pessoas, com uma mediana de 05 moradores (IQR=4-8). O tempo de moradia no domicílio variou de 1 mês a 70 anos, com uma mediana de 10 anos (IQR=8-14).

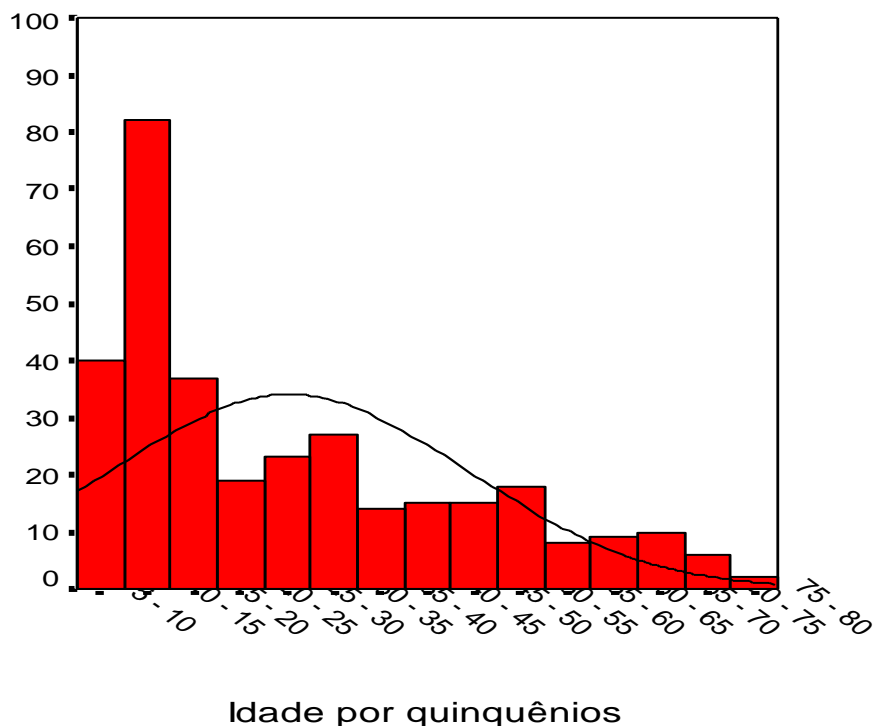


Figura 8. Distribuição por faixa etária em quinquênios e curva normal dos entrevistados

4.2. Frequência dos possíveis fatores influenciadores da resposta imune celular nos indivíduos pesquisados

A frequência de possíveis fatores relacionados com alteração da imunidade na população estudada está disposta na tabela 2. O número da amostra sofreu variação devido a não obtenção de resposta de algumas variáveis questionadas. Sintomas clínicos nos últimos quinze dias antes da entrevista, que pudessem interferir nas análises imunológicas, foram

questionados em 329 indivíduos. Dentre os entrevistados, 73 (22,2%) afirmaram possuir algum sintoma de adoecimento. A tosse estava presente em 45 (13,6%) pessoas, seguidas por febre 33 (10%), anorexia 25 (7,6%), dor muscular 22 (6,6%), perda de peso 12 (3,6%), diarreia 8 (2,4%). Vinte e três (31,5%) indivíduos com sintomas clínicos procuraram assistência médica, sendo diagnosticado síndrome gripal em todos os pacientes.

A presença de comorbidades foi avaliada em todos os indivíduos: hipertensão arterial sistêmica esteve presente em 28 (8,5%), insuficiência cardíaca em 2 (0,6%), diabetes em 8 (2,4%), AIDS em 1 (0,3%), doença reumática (artrose) em 4 (1,2%), uso de corticóide sistêmico em 1 (0,3%) dos entrevistados. Outras condições, como tuberculose, neoplasias, hipotireoidismo, hanseníase, medicamentos imunossupressores e gravidez, não foram encontradas na população estudada.

Imunização para tuberculose com uso de BCG, comprovada por cartão de vacina, foi avaliada em 76 (23%) dos indivíduos inclusos no estudo. Eles tinham entre 05 e 27 anos de idade, enquanto que 63,2% situavam-se entre 10 e 19 anos de idade. A média de idade dos comprovadamente vacinados foi de 11,3 (\pm DP 3,5) anos. O tempo entre a realização da BCG e a realização do teste de Montenegro, durante a segunda visita da coorte, variou de 0 a 23 anos. A média de tempo foi de 11,1 (\pm 3,8) anos. Outras imunizações, realizadas nos últimos seis meses, foram avaliadas em 326 indivíduos, sendo afirmativa em 51 (15,6%). Em ordem de frequência, a imunoprofilaxia para gripe foi aplicada em vinte e dois participantes, para tétano em dezenove, para hepatite B em oito, para sarampo e pólio em uma criança.

Tabela 2. Frequência de possíveis fatores relacionados com alteração da imunidade na população estudada

| Sintomas clínicos n= 329* | Sim | % |
|-----------------------------|-----|------|
| Febre | 33 | 10,0 |
| Tosse | 45 | 13,6 |
| Perda de peso | 12 | 3,6 |
| Anorexia | 25 | 7,6 |
| Dor muscular | 22 | 6,6 |
| Diarréia | 8 | 2,4 |
| Co-morbidades n= 331* | | |
| HAS | 28 | 8,5 |
| AIDS | 2 | 0,6 |
| Artrose | 4 | 1,2 |
| Corticóide sistêmico | 1 | 0,3 |
| Imunizações recentes n=326* | | |
| Uma dose | 38 | 11,7 |
| Duas doses | 10 | 3,1 |
| Quatro doses | 1 | 0,3 |

* n amostral variou de acordo com número de resposta obtidas.

4.3. Frequência dos fatores epidemiológicos analisados nos indivíduos pesquisados

Habitavam em casas de alvenaria 282 (85,2%) dos entrevistados; e 49 (14,8%), em casas de taipa. Essas habitações eram em áreas próximas a vegetação densa (até 1.000m), em locais com vazios urbanos, para 284 (85,8%) dos participantes. Um total de 237 (71,6%) pessoas moravam a menos de 50 metros desses locais.

Quanto à percepção, pelos participantes, de fatores epidemiológicos relacionados à transmissão da leishmaniose nas áreas estudadas, a presença de cães de aspecto doente nas proximidades da residência, nos últimos seis meses, foi reportada por 232 (70,1%) entrevistados. Trinta e cinco (10,6%) indivíduos afirmaram a presença de caso de cães notificados com

leishmaniose, pela Secretaria Municipal de Saúde, na vizinhança, embora ninguém referisse notificações em suas residências. O relato de notificação de flebotomíneos, pelos agentes de endemias, em suas residências foi feito por apenas quatro indivíduos (1,2%). Casos recentes de calazar na vizinhança, considerando os últimos seis meses, sabidamente existentes, foram relatados por 25 (7,6%) dos entrevistados. Apenas um participante afirmou a existência de casos de calazar nos últimos seis meses em sua residência. A distribuição dos fatores epidemiológicos relacionados com exposição à Leishmaniose visceral encontra-se na tabela 3.

Juntamente com essas condições, 265 (80,1%) pessoas possuíam animais no peridomicílio com uma mediana de 9 (IQR=3-22) animais (Tabela 4). Aves, do tipo galináceo, foram prevalentes, estando presentes nas residências de 193 (58,3%) entrevistados. A mediana da quantidade de galináceos foi de 12 (IQR=5,5-20) animais. Desses criadores, 90 (46,6%) possuíam galinheiros em peridomicílio com distância de 01 a 30 metros com mediana de 8 (IQR=5-10) m. Em segundo lugar, vieram os cães como animais em contato peridomiciliar com 176 (53,1%) indivíduos, com uma mediana de dois (IQR=1-3) animais. Os gatos estavam presentes como animais domésticos para 122 (36,8%) participantes, com uma mediana de um (IQR=1-3) animal. Por fim, os suínos tinham contato com 30 (9,1%) dos entrevistados.

Tabela 3. Frequencia dos fatores epidemiológicos relacionados com exposição à leishmânia presente nos entrevistados

| Condição | Sim | % |
|--|-----|------|
| Tipo da casa | | |
| Alvenaria | 282 | 85,2 |
| Taipa | 49 | 14,8 |
| Casa próxima a vegetação (< 1000m) | 284 | 85,8 |
| Distância da vegetação | | |
| < 50 m | 237 | 71,6 |
| ≥ 50 e < 500 m | 36 | 10,9 |
| ≥ 500 e < 1000m | 11 | 3,3 |
| ≥ 1000m | 20 | 6,0 |
| Observa cães doentes próximos a residência | 232 | 70,1 |
| Refere cães com calazar próximos a residência | 35 | 10,6 |
| Refere flebotomíneos encontrados na residência | 4 | 1,2 |
| Refere casos LV na vizinhança | 25 | 7,6 |
| Refere casos LV na residência | 1 | 0,3 |

Tabela 4. Presença de animais nos peridomicílios e mediana (IQR) encontrada

| | Sim | % | Mediana (IQR)* |
|--------------------------|-----|------|----------------|
| Animais em peridomicílio | 265 | 80,1 | 9 (3-22) |
| Galinhas | 193 | 58,3 | 12 (5,5-20) |
| Cães | 176 | 53,1 | 2 (1-3) |
| Gatos | 122 | 36,8 | 1(1-3) |
| Suínos | 30 | 9 | 1 (1-4) |

* IQR = intervalo interquartil

Foram realizadas avaliações clínicas, exame físico e sorologias para detecção de anticorpos para antígenos solúveis de *Leishmania* (SLA) em 184 cães de 26 (63,4%) dos 41 bairros estudados. Reações sorológicas positivas foram encontradas em 65 (35,3%) cães examinados. Oitenta e um (24,5%) indivíduos possuíam contato com os cães analisados em seus domicílios. A presença de um cão soropositivo no domicílio estava presente em 37 (45,7%) dos 81 indivíduos estudados e dois cães soropositivos estavam presentes em 8 (9,9%). Cães sintomáticos foram encontrados em convivência com 32 (39,5%) desse grupo de entrevistados.

Um total de 116 casos de LV humana foi notificado, nos últimos seis anos, pela Secretaria Municipal de Saúde, em 30 (75,5%) dos 41 bairros estudados. Esses bairros se localizam em 9 (90%) das 10 cidades inclusas. Nesses bairros, residiam 302 (91,2%) dos 331 indivíduos estudados. O número de casos por bairro variou de 1 a 9, com uma mediana de 3 (IQR=2-5). O tempo entre as notificações e o nosso estudo teve uma mediana de 3 anos (IQR=1-4).

4.4. Avaliação nutricional dos pesquisados

A avaliação nutricional foi realizada para 270 (81,5%) dos 331 participantes. O índice de massa corpórea (IMC) observado foi normal em 184 (68,1%), baixo peso em 11 (4,1%), sobrepeso 53 (19,6%), e obesos em 22 (8,1%) dos voluntários (figura 9). Portanto, preocupante é o achado de que 27,7% dos indivíduos avaliados (75 de 270) apresentavam peso acima do normal. Cento e vinte e dois adultos apresentavam risco de complicações metabólicas em relação à circunferência abdominal e razão cintura – quadril (Tabela 5). A classificação quanto a esse risco foi ausente em 59 (48,4%),

aumentado em 28 (23%) e muito elevado em 35 (28,7%) dos avaliados. Com relação à razão cintura – quadril, o risco estava presente em 81 (66,4%) indivíduos.

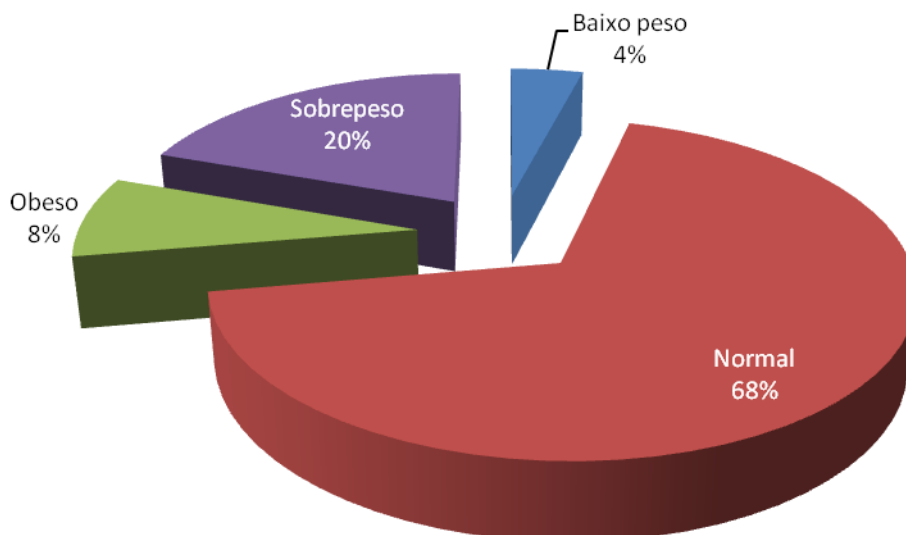


Figura 9. Proporção de indivíduos entrevistados por classificação de IMC

Tabela 5. Frequência do risco de complicações metabólicas, de acordo com circunferência abdominal e cintura quadril, nos entrevistados

| Avaliação nutricional n=122 | Sim | % |
|---------------------------------------|-----|------|
| Risco circunferência abdominal | | |
| Ausente | 59 | 48,4 |
| Aumentado | 28 | 23 |
| Muito elevado | 35 | 28,7 |
| Razão cintura quadril | | |
| Risco presente | 81 | 66,4 |
| Risco ausente | 41 | 33,6 |

Análises hematimétricas de eritograma e leucograma foram realizadas em 302 participantes (Tabela 6), considerando a faixa etária e o sexo. A hemoglobina média para os homens adolescentes e adultos, acima de 12 anos (N=99), foi de 13,2 g/dl (DP \pm 1,8) com um hematócrito médio de 41,6% (DP \pm 5,4). As mulheres nessa mesma faixa etária (N=137) tiveram uma hemoglobina média de 12,3 g/dl (DP \pm 1,2) e hematócrito com mediana de 39% (IQR=37-41). As crianças menores de 12 anos (N= 66) obtiveram hemoglobina média de 12,0 g/dl (DP \pm 1,31) e hematócrito médio de 37,2% (DP \pm 3,6). Eosinofilia foi encontrada nas crianças analisadas, em que houve uma mediana da contagem relativa dos eosinófilos de 10% (IQR=4-14). Oitenta e sete por cento (58/66) das crianças apresentavam valores acima de 3% de eosinófilos por contagem de leucócitos totais. A mediana da contagem relativa de eosinófilos, na população adulta estudada, foi de 6% (IQR=3-12).

A presença de anemia foi avaliada nos homens (Hb < 12,8 g/dl) e mulheres (Hb < 11,3 g/dl) adultos e população infantil abaixo de 12 anos (Hb < 11 g/dl). Nos homens adultos, a anemia foi presente em 31,3% (31/99) com mediana de 11,8 g/dl (IQR=11,2-12,5). Nas mulheres adultas, em 15,3% (21/137) com uma mediana de 10,8 (IQR=10,3-11). Na população infantil, a anemia estava presente em 31,8% (21/66). Ao todo, houve um total de 73 (24,2%) indivíduos analisados com níveis de hemoglobina abaixo da normalidade de acordo com sexo e faixa etária. A frequência percentual da anemia nos homens e mulheres adultos e na população infantil está na figura 10.

Tabela 6. Dados hematimétricos, da serie vermelha e eosinófilos, de acordo com sexo e faixa etária

| | Homens (n=99) | Mulheres (n=137) | Crianças <12a (n= 66) |
|------------------|--|-------------------|-------------------------|
| | Média (\pm DP)* ou mediana (IQR) [§] | | |
| Hematócrito % | 41,6% (\pm 5,4). | 39% (37-41) | 37,2% (\pm 3,6) |
| Hemoglobina g/dl | 13,2 (\pm 1,8) | 12,3 (\pm 1,2) | 12,0 g/dl (\pm 1,31) |
| Eosinófilos % | 6 (4-13) | 6 (3-11) | 10 (4-14) |

* DP= desvio padrão, [§]IQR= intervalo interquartil

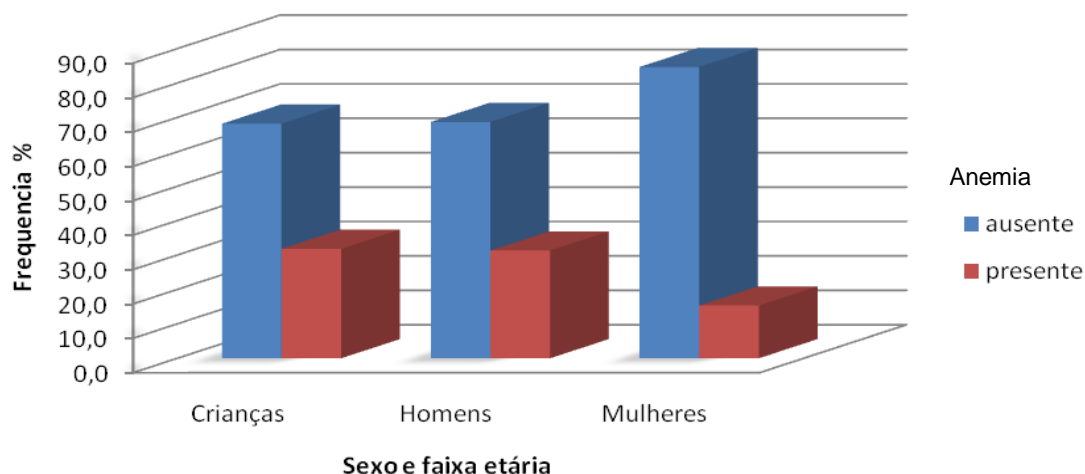


Figura 10. Frequencia percentual encontrada de anemia nos adultos, de acordo com sexo, e na população infantil

4.5. Marcadores de infecção por leishmânia e mensuração de DTH

Na primeira visita, entre os anos 1996 a 2005, durante estudo familiar, o diagnóstico prévio de leishmaniose visceral, a intradermorreação de Montenegro e sorologia foram analisados em 331 participantes, que se classificaram entre os quatro fenótipos definidos. Desses, 51 (15,4%) tiveram antecedentes de leishmaniose visceral: 153 (46,2%) eram DTH positivos; 8 (2,4%) tiveram anticorpos (AC) positivos, e 119 (35,9%) eram não infectados (LV/DTH/AC negativos).

O estudo de seguimento foi realizado nos de 2005, 2007 e 2009. O tempo de coorte entre a primeira e segunda visita variou de 2 a 10 anos, conforme figura 11. Todos os indivíduos analisados na primeira visita foram novamente classificados (Tabela 7). Desses, 51 (15,4%) foram mantidos com passado de leishmaniose visceral, 193 (58%) eram DTH positivos, 8 (2,4%) tinham anticorpos positivos e 80 (24,1%) eram não infectados (LV/DTH/AC negativos).

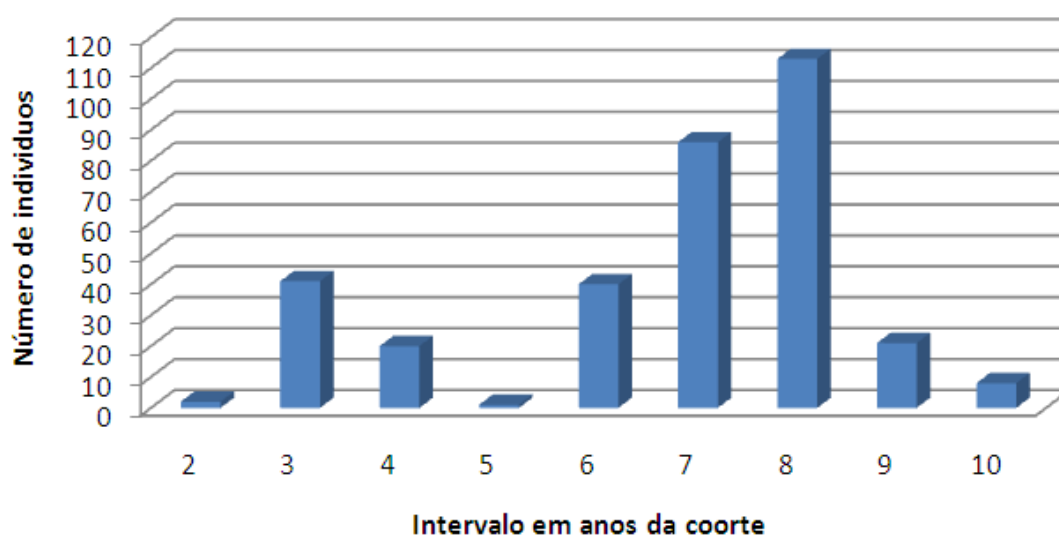


Figura 11. Número de indivíduos de acordo com o intervalo de anos da coorte

Tabela 7. Frequência dos entrevistados, conforme os fenótipos, na primeira e segunda visita da coorte

| Classificação fenotípica | 1ª visita | 2ª visita |
|--------------------------|-------------|-------------|
| | n (%) | |
| LV | 51 (15,4%) | 51 (15,4%) |
| DTH + | 153 (46,2%) | 193 (58,3%) |
| DTH -/AC+ | 8 (2,4%) | 8 (2,4%) |
| DTH- /AC - | 119 (35,9%) | 79 (23,9%) |
| Total | 331 | 331 |

A variação de classificação fenotípica, entre as duas visitas, foi verificada em 280 participantes, dos quais foram excluídos os 51 indivíduos que tinham passado de LV, já que para esses o fenótipo não variou (Tabela 8). Do total de 280, 129 (46,1%) mantiveram a resposta DTH (+/+), 24 (8,6%) perderam a resposta DTH (+/-), 64 (22,8%) desenvolveram uma resposta DTH (-/+), 5 (1,8%) tornaram-se soropositivos AC (-/+), 6 (2,1%) tornaram-se soronegativos AC (+/-), 1 (0,4%) manteve-se soropositivo AC (+/+) e 51 (18,2%) mantiveram-se negativos em todos os parâmetros (não infectados).

Analisando o grupo dos entrevistados apenas com sorologia positiva (AC+), um manteve-se positivo entre as duas verificações, cinco tornaram-se sororreagentes e dois, antes DTH +, tornaram-se AC+. Entretanto, nenhum desses tornou-se sintomático durante o período do nosso trabalho.

Tabela 8. Variação da classificação fenotípica dos indivíduos, entre as duas visitas realizadas

| Variação fenotípica | N | % |
|---------------------|-----|------|
| DTH (+/+) | 129 | 46,1 |
| DTH (+/-) | 24 | 8,6 |
| DTH (-/+) | 64 | 22,8 |
| AC (+/+) | 1 | 0,4 |
| AC (+/-) | 6 | 2,1 |
| AC (-/+) | 5 | 1,8 |
| Não infectados | 51 | 18,2 |
| Total | 280 | 100 |

Analisando apenas a resposta ao DTH com todos os entrevistados, cento e oitenta (55,4%) inclusos possuíam, na primeira avaliação, intradermorreação de Montenegro positiva, variando de 5 a 40 mm, com uma mediana de 14 mm (IQR=10-20). No estudo de seguimento, 244 (73,7%) foram reatores positivos, com enduração variando de 5 a 45 mm e mediana de 11 mm (IQR=7-15). A avaliação temporal quanto às respostas ao teste de Montenegro, entre as duas análises, para os 331 inclusos no estudo (Tabela 9), nos mostrou que 156 (46,1%) permaneceram positivos, 24 (7,3%) tornaram-se DTH negativos, 89 (26,9%) positivaram e 62 (18,7%) permaneceram negativos. A perda da resposta DTH, entre todos os positivos durante a primeira visita, foi de 7,3% (24/331). Excluindo-se do total de positivos da primeira avaliação (n=180) que também eram casos prévios de LV (n=27) e analisando-se apenas os inicialmente positivos ao DTH assintomáticos (n=153), a perda da resposta DTH ocorreu em 15,7% (24/153).

Dos 51 indivíduos com passado de LV, inclusos no presente estudo, 10 (19,6%) foram diagnosticados durante as visitas de campo realizadas na primeira visita. Seus testes de Montenegro iniciais eram negativos e possuíam uma enduração média de 4 mm. Quatro desses pacientes apresentaram sintomas de LV no primeiro exame, cujos anticorpos antileishmania eram positivos, sendo então admitidos e tratados em hospital de referência. Os outros seis indivíduos, que eram assintomáticos e apresentavam anticorpos negativos antileishmania, desenvolveram a doença dentro de um ano após a visita inicial. Nesse grupo de 51 inclusos, 24 (47%) mostravam-se com DTH negativos no momento da primeira visita.

No seguimento, os indivíduos com passado de LV apresentavam idade com mediana de 11 anos (IQR= 9-17) e 31 (60,8%) eram do sexo masculino. Todos possuíam Montenegro positivo com uma média de enduração de 12 (DP \pm 4,5) mm. O tempo médio da coorte para esses participantes foi de 6,4 anos (DP \pm 2,0). O tempo entre o tratamento para LV e a realização do teste de Montenegro inicial variou de 0 a 6 anos, mediana de 2 anos (IQR=0-3), enquanto que entre o tratamento e a análise de seguimento foi de 4 a 14 anos com mediana de 8 anos (IQR=7-9).

A tabela 10 resume as características dos indivíduos estudados quanto ao sexo, aos níveis de SLA, ao tamanho do DTH e à idade, no momento da primeira e da segunda medições, de acordo com os fenótipos (LV sintomática ou infecção assintomática) ao longo do tempo.

Tabela 9. Variação da positividade ao teste de Montenegro (DTH) nos entrevistados, ocorrida entre as duas visitas realizadas

| Variação do DTH | N | % |
|-----------------|-----|-------|
| (+/+) | 156 | 47,1 |
| (-/+) | 89 | 26,9 |
| (-/-) | 62 | 18,7 |
| (+/-) | 24 | 7,3 |
| Total | 331 | 100,0 |

Tabela 10. Características dos indivíduos estudados, quanto à absorvência do extrato solúvel de antígenos (SLA), mensuração do DTH e idade, na primeira e segunda visita da coorte, considerando LV sintomática e infecção assintomática

| Fenótipos | | Características (n), média e EP | | | | | | |
|---------------------|--------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|
| | | SLA1 ^{(1) (2)} | SLA2 ^{(1) (2)} | DTH1 ⁽¹⁾ ,mm | DTH 2 ⁽¹⁾ ,mm | Idade 1 ⁽¹⁾ | Idade2 ⁽¹⁾ | Sexo masc (n, %) |
| LV | Sintomáticos | (10) 0.15 ±0.57 | (10) 0.43 ±0.48 | (10) 2.40 ±2.00 | (10) 12.90 ±1.90 | (10) 12.30 ±7.03 | (10) 19.40 ±7.09 | (10) 50.00% |
| | Recuperados | (39) 0.47 ±0.26 | (39) 0.61 ±0.18 | (41) 8.85 ±1.23 | (41) 12.76 ±0.65 | (41) 9.12 ±1.55 | (41) 15.39 ±1.56 | (41) 63.41% |
| Assintomá- ticos | DTH +/+ | (128) 1.51 ±0.13 | (123) -0.85 ±0.09 | (129)16.09 ±0.68 | (129)13.40 ±0.64 | (129)31.06 ±1.68 | (129) 37.97 ±1.68 | (129) 36.43% |
| | DTH +/- | (128) 2.06 ±0.29 | (24) -1.06 ±0.16 | (24) 8.63 ±1.04 | (24) 1.96 ±0.41 | (24) 18.75 ±3.32 | (24) 25.42 ±3.34 | (24) 41.67% |
| | DTH -/- | (51) -1.72 ±0.19 | (51) -1.24 ±0.12 | (51) 0.29 ±0.14 | (51) 1.20 ±0.25 | (50) 12.26 ±1.97 | (50) 18.34 ±2.06 | (51) 37.25% |
| | DTH -/+ | (64) -1.91 ±0.20 | (64) -1.12 ±0.10 | (64) 0.28 ±0.12 | (64) 9.64 ±0.82 | (64) 18.92 ±2.40 | (64) 25.89 ±2.44 | (64) 46.88% |

(1) média ± EP, onde EP ($SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$ e $CI(95\%) = mean \pm 1.96 SE$) (2) $\log\left(\frac{SLA}{Cut\ Off}\right)$.

SLA1: absorvência do extrato solúvel de antígenos na primeira visita da coorte, SLA2: absorvência do extrato solúvel de antígenos na segunda visita da coorte, DTH 1: mensuração do DTH na primeira visita da coorte, DTH 2: mensuração do DTH na segunda visita da coorte, Idade 1: idade na primeira visita da coorte, Idade 2: idade na segunda visita da coorte.

4.6. Análises de correlação entre resposta ao teste de Montenegro e níveis de anticorpos nos indivíduos com passado de LV quanto ao tempo póstratamento

A análise conjunta da resposta ao teste de Montenegro, em milímetros, e dos níveis de anticorpos, por densidade óptica (D.O), de acordo com o tempo pós tratamento, em anos, dos indivíduos com passado de LV mostra um aumento concomitante no tamanho da endureção (Spearman $r = 0,3$, $p = 0,03$), coincidindo com a diminuição dos níveis de anticorpos (Spearman $r = -0,5$, $p = 0,0003$, Figura 12).

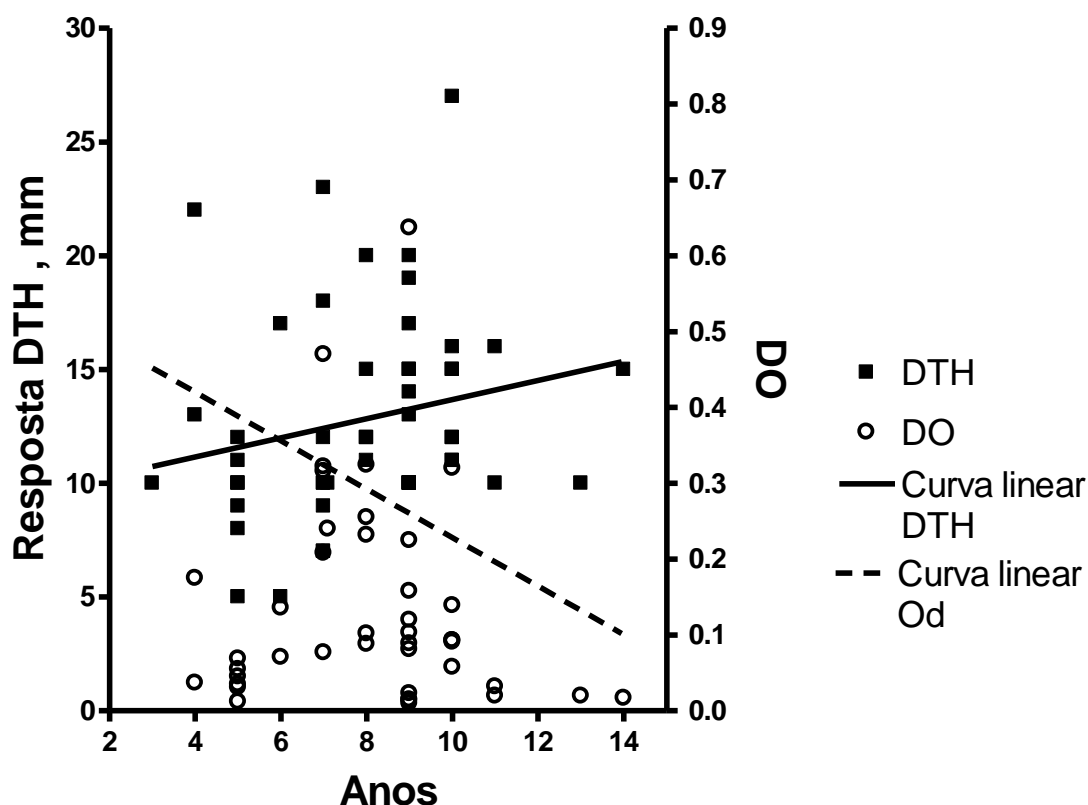


Figura 12. Curvas lineares da resposta DTH e absorbância de anticorpos em indivíduos com leishmaniose visceral de acordo com o tempo póstratamento

4.7. Análises univariadas entre fatores epidemiológicos e resposta DTH na visita de seguimento

4.7.1. Fatores demográficos

Quanto à influência da idade, as análises mostram uma associação significativa com a resposta DTH pelo teste Mann-Whitney ($p = 0,001$), em que a mediana entre DTH+ foi de 25 anos (IQR=13-45) e nos DTH-, foi de 14 (IQR=10-31) anos (Figura 13). Excetuando-se aqueles com passado de LV, que possuíam mediana de 11 anos, a associação da idade permaneceu significativa com ($p=0,001$), pelo teste Mann-Whitney, com uma mediana de 30 (IQR=16-50) anos para os DTH+ e de 14 (IQR=10-31) anos para os DTH-. Essa associação foi corroborada analisando-se o tamanho da endureção nos DTH positivos (sem casos de LV) e a idade através da correlação de Spearman (Spearman $r=0,27$, $p = 0,0002$) (Figura 14). Como mostra a tabela 11, o sexo não se mostrou associado com a positividade da reação DTH ($\chi^2 = 1,47$, $p = 0,22$). A mudança de residência, embora todos permanecessem em áreas de transmissão de leishmaniose, não foi associada com a positividade da reação ($\chi^2 = 0,0000359$, $p = 0,99$).

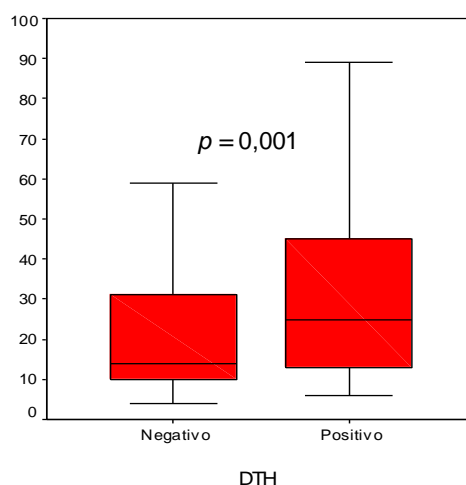


Figura 13. Mediana da idade dos indivíduos conforme resultado do DTH

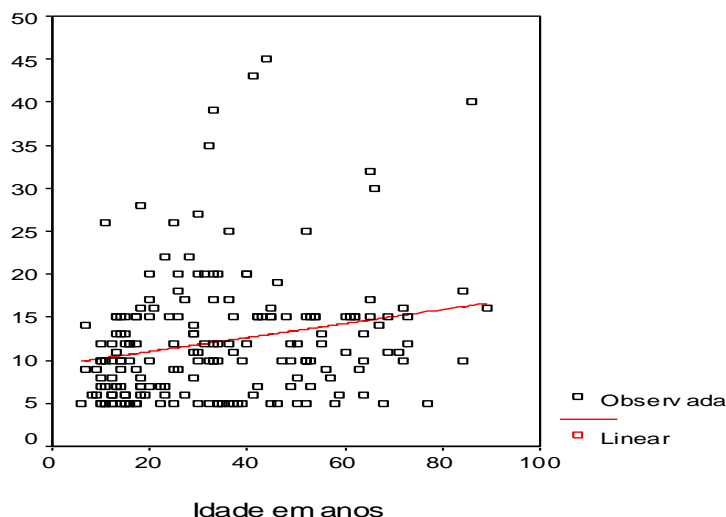


Figura 14. Curva linear entre DTH em mm e idade em anos

4.7.2. Sintomas clínicos

A presença de sintomas clínicos de infecção, nos 15 dias antecedentes à aplicação do teste, não foi associada com a resposta DTH ($\chi^2 = 1,95$, $p = 0,38$), como também nas análises isoladas dos sintomas, como febre ($\chi^2 = 0,94$, $p = 0,33$), tosse ($\chi^2 = 1,33$, $p = 0,25$), mialgias ($\chi^2 = 0,15$, $p = 0,69$) e diarreia ($\chi^2 = 2,4$, $p = 0,21$ Fisher).

4.7.3. Antecedentes patológicos e imunizações

Nenhum dos antecedentes avaliados se mostrou associado com a resposta DTH pelo teste exato de Fisher, como: hipertensão arterial sistêmica ($p=0,069$), diabetes ($p=1,0$), insuficiência cardíaca ($p=1,0$), doença reumática ($p=0,57$) e AIDS ($p=1,0$). A eosinofilia, como indicador de possíveis parasitoses intestinais, não se associou com resposta ao teste ($\chi^2 = 1,60$, $p=0,20$). As imunizações realizadas nos últimos seis meses também não se mostraram associadas com a resposta DTH ($\chi^2 = 0,21$, $p = 0,64$), bem como as análises

individualizadas de vacina para tétano ($\chi^2 = 1,49$, $p = 0,22$), sarampo ($p = 1,0$), poliomielite ($p = 0,26$) e gripe ($p = 0,21$), sendo as três últimas análises pelo teste exato de Fisher. Entretanto, o histórico de calazar prévio foi fortemente associado com a positividade da reação DTH, visto que todos os indivíduos com esse diagnóstico foram reatores na visita de seguimento (M-L $\chi^2 = 34,43$, $p = 0,00001$).

4.7.4. Fatores nutricionais

Alterações metabólicas, decorrentes de fatores nutricionais, mensurados pela classificação do IMC ($\chi^2 = 2,10$, $p = 0,55$), bem como as avaliações na população adulta, de circunferência abdominal ($\chi^2 = 4,95$, $p = 0,08$) e relação cintura-quadril ($\chi^2 = 0,78$, $p = 0,37$) não foram associadas com a resposta DTH. Quando estratificadas apenas em dois grupos, se o indivíduo possui classificação de IMC normal ou alterada (inclui baixo peso, sobrepeso e obeso), não se observou influência sobre a resposta imune celular ($\chi^2 = 0,95$, $p = 0,32$). As análises hematimétricas do eritrograma, abaixo dos valores normais para a idade, que pudessem estar associadas com desnutrição, classificadas pela presença ou não de anemia, igualmente não foram significativas ($\chi^2 = 0,84$, $p = 0,77$).

Tabela 11. Análises univariadas de acordo com a positividade da intradermoreação de Montenegro e fatores individuais

| Variáveis | Reação DTH | | | | Valor de <i>p</i> |
|---------------------------------------|--------------------|-----------|--------------------|------------|-------------------|
| | Negativa | | Positiva | | |
| | Total ¹ | n* (%) | Total ² | n* (%) | |
| Demográficas | | | | | |
| Sexo masculino | 87 | 32 (36,8) | 244 | 108 (44,3) | 0,22 |
| Mudou de residência | 87 | 15 (17,2) | 244 | 42 (17,2) | 0,99 |
| Exposição a antígenos | | | | | |
| Sintomas clínicos recentes | 87 | 23 (26,4) | 244 | 50 (20,7) | 0,38 |
| Febre | 87 | 11 (12,6) | 244 | 22 (9) | 0,33 |
| Tosse | 87 | 15 (17,2) | 244 | 30 (12,3) | 0,25 |
| Mialgias | 87 | 5 (5,7) | 244 | 17 (7) | 0,69 |
| Antecedentes mórbidos | | | | | |
| HAS | 86 | 3 (3,5) | 244 | 25 (10,2) | 0,069 |
| Diabetes | 86 | 2 (2,3) | 244 | 6 (2,5) | 0,94 |
| Parasitoses (eosinofilia) | 75 | 60 (80) | 230 | 198 (86,1) | 0,20 |
| Calazar | 87 | 0 (0) | 244 | 51 (21) | 0,0001 |
| Imunizações recentes | | | | | |
| Vacinas nos últimos 6 meses | 85 | 12 (14,1) | 240 | 39 (16,3) | 0,64 |
| Vacina tétano | 77 | 7 (9,1) | 230 | 12 (5,2) | 0,22 |
| Vacina gripe | 85 | 3 (3,5) | 239 | 19 (7,9) | 0,21 |
| Nutricionais | | | | | |
| IMC alterado | 70 | 10 (27,1) | 200 | 67 (63,5) | 0,32 |
| Anemia | 74 | 16 (21,6) | 228 | 53 (23,2) | 0,77 |
| Risco razão cintura-quadril presente* | 29 | 21 (72,4) | 93 | 57 (67,1) | 0,37 |
| Risco circunferência abdominal* | 29 | 17 (58,6) | 93 | 45 (52,9) | 0,08 |

¹ Total de DTH positivos na variável analisada, ² Total de negativos na variável analisada.

n* Número de respostas afirmativas a variável analisada.

*n amostral com os adultos acima de 18 anos.

4.7.5. Fatores ambientais

A associação com fatores ambientais (tabela 12), sabidamente relacionados com risco de transmissão vetorial, como tipo de moradia ($\chi^2 = 0,10$, $p = 0,75$), residência próxima à vegetação ($\chi^2 = 0,16$, $p = 0,68$) e presença de animais no peridomicílio ($\chi^2 = 0,11$, $p = 0,91$) não mostrou significância com reação ao DTH. Especificamente, a presença no peridomicílio de galináceos ($\chi^2 = 0,41$, $p = 0,52$), suínos ($\chi^2 = 0,14$, $p = 0,70$) e gatos ($\chi^2 = 1,10$, $p = 0,29$) não mostraram significância. A presença de cães no domicílio ($\chi^2 = 0,25$, $p = 0,61$), a observação de cães, com aparência doente, nas proximidades do domicílio ($\chi^2 = 0,67$, $p = 0,40$), bem como a soropositividade dos cães, pertencentes aos entrevistados ($\chi^2 = 1,80$, $p = 0,25$), também não influenciaram a resposta imune celular. Por fim, quando foi avaliado o número de casos humanos notificados nos últimos seis anos (figura 15), na localidade de residência do entrevistado, e o número de cães soropositivos notificados pela Secretaria de Saúde, eles não se mostraram associados (Mann-Whitney teste) com a positividade da intrademorreação dos participantes ($p = 0,90$ e $p = 0,87$, respectivamente).

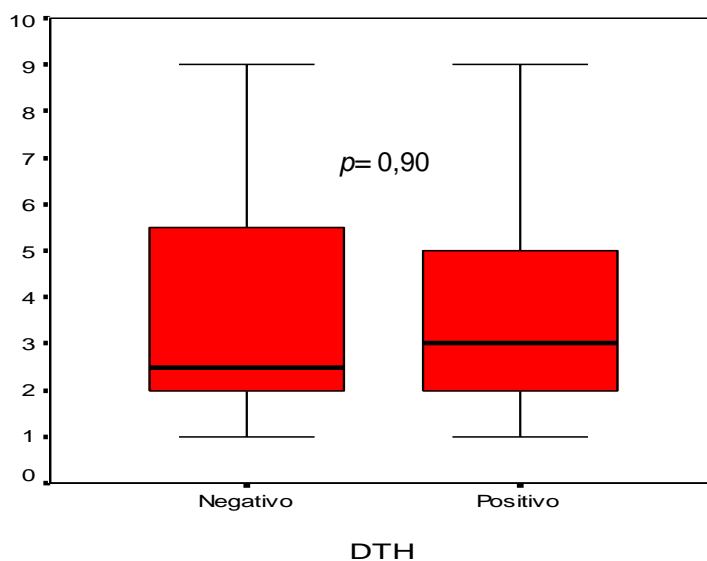


Figura 15. Mediana do número de casos de LV humana, nos últimos 6 anos, na região do domicílio dos indivíduos, e resultado da reação DTH

Tabela 12. Análises univariadas de acordo com exposição ambiental e positividade da intradermorreação de Montenegro

| Exposição ambiental | Reação DTH | | | | Valor de <i>p</i> |
|--|--------------------|-----------|--------------------|------------|-------------------|
| | Negativa | | Positiva | | |
| | Total ¹ | n* (%) | Total ² | n* (%) | |
| Moradia em casa de taipa | 87 | 12 (13,8) | 244 | 37 (15,2) | 0,75 |
| Residência próxima à vegetação | 87 | 79 (90,8) | 244 | 225 (92,2) | 0,68 |
| Animais no peridomicílio | 87 | 70 (80,5) | 244 | 195 (79,9) | 0,91 |
| Galináceos no peridomicílio | 87 | 53 (60,9) | 244 | 139 (57) | 0,52 |
| Cães no domicílio | 87 | 48 (52,2) | 244 | 127 (52) | 0,61 |
| Observa cães doentes próximos ao domicílio | 87 | 64 (73,6) | 244 | 168 (68,9) | 0,40 |
| Cães soropositivos no domicílio | 15 | 6 (40) | 66 | 39 (59,1) | 0,17 |

¹ Total de DTH positivos na variável analisada, ² Total de negativos na variável analisada.
n* Número de respostas afirmativas a exposição.

4.8. Análises univariadas entre fatores epidemiológicos e resposta DTH na visita de seguimento sem casos de LV

Baseando-se na influência do histórico progresso de leishmaniose visceral na resposta DTH, foram realizadas outras análises entre os fatores epidemiológicos e resultado da reação em amostragem desconsiderando-se aqueles que tinham passado de calazar. Utilizou-se novamente o teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher para dados dicotômicos. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para dados quantitativos que não possuem distribuição normal entre duas categorias e a correlação de Spearman para associação entre dados quantitativos e mensuração da endureção do Montenegro em milímetros.

De um modo geral, os resultados observados, quanto à significância estatística, não foram díspares dos encontrados quando analisada a população total (tabelas 13, 14 e figura 16), exceto pela associação encontrada entre portadores de hipertensão arterial sistêmica e resposta positiva ao DTH pelo teste exato de Fisher. Contudo, esse achado se deveu à influência da variável idade na hipertensão, visto que a mediana da idade entre os hipertensos foi de 57 (IQR 52-69) e nos não hipertensos, de 21 (IQR 13-37), com diferença estatisticamente significativa pelo teste de Mann-Whitney ($p=0,001$), como visto na figura 17. Para confirmar a influência da idade na análise, a amostra foi estratificada com os indivíduos acima de 30 anos. Nesse estrato, não foi observada associação entre hipertensão e resposta DTH (Fisher $p=0,41$).

Tabela 13. Análises univariadas de acordo com fatores individuais e positividade da intradermoreação de Montenegro na amostra sem casos de LV

| Variáveis | Reação DTH | | | | Valor de <i>p</i> |
|---|--------------------|-----------|--------------------|------------|-------------------|
| | Negativa | | Positiva | | |
| | Total ¹ | n* (%) | Total ² | n* (%) | |
| Demográficas | | | | | |
| Sexo masculino | 87 | 32 (36,8) | 193 | 77 (39,9) | 0,62 |
| Mudou de residência | 87 | 15 (17,2) | 193 | 33 (17,1) | 0,97 |
| Exposição a antígenos | | | | | |
| Sintomas clínicos recentes | 87 | 23 (26,4) | 191 | 40 (20,9) | 0,31 |
| Febre | 87 | 11 (12,6) | 193 | 16 (8,3) | 0,25 |
| Tosse | 87 | 15 (17,2) | 193 | 24 (12,4) | 0,28 |
| Mialgias | 87 | 5 (5,7) | 193 | 13 (6,7) | 0,75 |
| Antecedentes morbidos | | | | | |
| HAS | 86 | 3 (3,5) | 193 | 24 (12,4) | 0,03* |
| Diabetes | 86 | 2 (2,3) | 193 | 6 (3,1) | 1,0* |
| Parasitoses (eosinofilia) | 75 | 60 (80) | 180 | 158 (87,8) | 0,1 |
| Imunizações recentes | | | | | |
| Vacinas nos últimos 6 meses | 85 | 12 (14,1) | 189 | 35 (18,5) | 0,37 |
| Vacina tétano | 77 | 7 (9,1) | 179 | 9 (5) | 0,22* |
| Vacina gripe | 85 | 3 (3,5) | 188 | 19 (10,1) | 0,09* |
| Nutricionais | | | | | |
| IMC alterado | 70 | 19 (27,1) | 160 | 59 (36,9) | 0,15 |
| Anemia | 74 | 16 (21,6) | 179 | 40 (22,3) | 0,89 |
| Risco razão cintura quadril presente [§] | 29 | 21 (72,4) | 85 | 57 (67,1) | 0,59 |
| Risco circunferência abdominal [§] | 29 | 17 (58,6) | 85 | 45 (52,9) | 0,09 |

¹ Total de DTH positivos na variável analisada, ² Total de negativos na variável analisada.

n* Número de respostas afirmativas a variável analisada.

* Teste exato de Fisher

§ n amostral com os adultos acima de 18 anos

Tabela 14. Análises univariadas de acordo com exposição ambiental e positividade a intradermorreação de Montenegro na amostra sem casos de LV

| Exposição ambiental | Reação DTH | | | | Valor de <i>p</i> |
|--|--------------------|-----------|--------------------|------------|-------------------|
| | Negativa | | Positiva | | |
| | Total ¹ | n* (%) | Total ² | n* (%) | |
| Moradia em casa de taipa | 87 | 12 (13,8) | 193 | 31 (16,1) | 0,62 |
| Residência próxima á vegetação | 87 | 79 (90,8) | 193 | 183 (94,8) | 0,20 |
| Animais no peridomicílio | 87 | 70 (80,5) | 193 | 154 (79,8) | 0,89 |
| Galináceos no peridomicílio | 87 | 53 (60,9) | 193 | 109 (56,7) | 0,48 |
| Cães no domicílio | 87 | 48 (52,2) | 193 | 101 (52,3) | 0,65 |
| Observa cães doentes próximos ao domicílio | 87 | 64 (73,6) | 193 | 131 (67,9) | 0,33 |
| Cães soropositivos no domicílio | 15 | 6 (40) | 50 | 30 (60) | 0,17 |

¹ Total de DTH positivos na variável analisada, ² Total de negativos na variável analisada.
n* Número de respostas afirmativas a exposição.

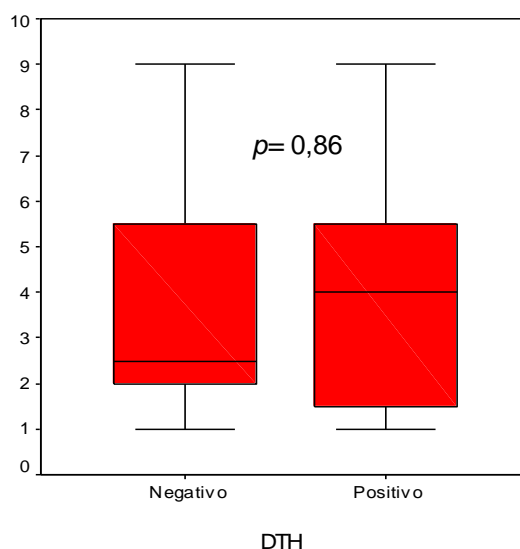


Figura 16. Mediana do número de casos de LV, nos últimos 6 anos, na região do domicílio dos indivíduos, e resultado da reação DTH na amostra sem casos de LV

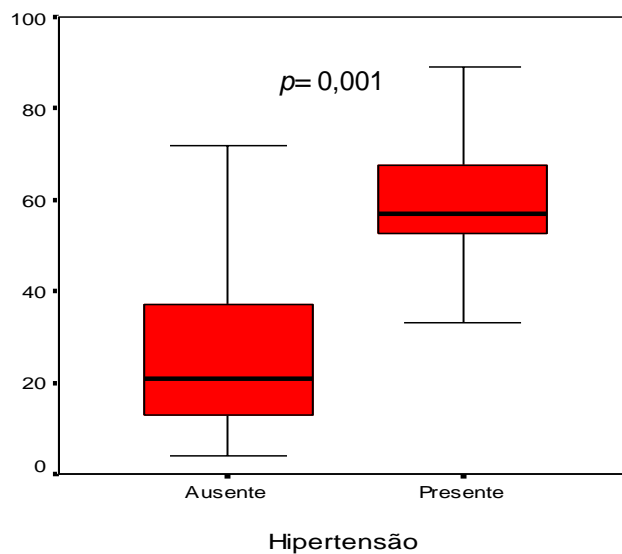


Figura 17. Mediana da idade e intervalo interquartil entre hipertensos ou não na amostra sem casos de LV

4.9. Análises univariadas entre fatores epidemiológicos e variação do DTH no estudo de coorte

Foram realizadas análises univariadas entre os fatores epidemiológicos avaliados e a associação com a manutenção (DTH +/+) ou perda (DTH +/-) da resposta imune celular entre os dois momentos de avaliação. Para essas análises, foram excluídos os indivíduos com passado de leishmaniose visceral, por ter-se demonstrado a associação dessa variável com a manutenção da reação.

As idades mais elevadas se mostraram fortemente associada com a manutenção da resposta imune celular (Mann-Whitney, $p= 0,02$), conforme figura 18. Quanto ao sexo, não houve associação significativa com a modificação da resposta ao longo do tempo ($\chi^2 = 0,23$ $p = 0,62$). A mudança de residência entre as duas avaliações não foi significativa com a mudança no

perfil de resposta (Fisher, $p = 1,0$). As análises univariadas, quanto à mudança da resposta DTH, nos fatores estudados estão na tabela 15.

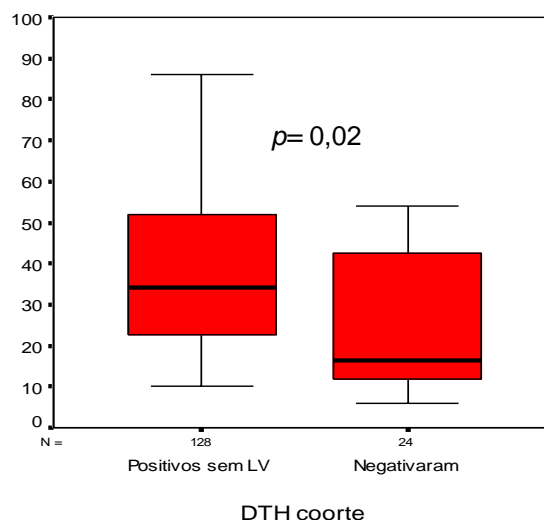


Figura 18. Mediana da idade entre os indivíduos mantenedores e perdedores da resposta DTH na coorte

Fatores individuais de sintomas clínicos recentes, nos últimos quinze dias antes da realização do teste, não se mostraram associados com a alteração da resposta ($\chi^2 = 0,63$ $p = 0,80$). Comorbidades como hipertensão arterial sistêmica, diabetes, insuficiência cardíaca e doença reumática não possuíam número de portadores para realização da análise nessa amostra. A eosinofilia, como indicador de possíveis parasitoses intestinais (Fisher, $p = 0,47$), e imunizações realizadas nos últimos seis meses (Fisher, $p = 0,41$) não se mostraram associados com modificação da resposta. A avaliação nutricional do IMC, normal ou alterado ($\chi^2 = 1,0$, $p = 0,32$), e a presença ou não de anemia igualmente não foram significativas ($\chi^2 = 0,58$, $p = 0,44$).

Exposição ambiental, favorecedores da cadeia de transmissão da leishmaniose, como tipo de moradia (Fisher, $p = 1,0$), residência próxima a áreas de vegetação (Fisher, $p = 1,0$), presença de animais no peridomicílio (χ^2

= 0,19, $p = 0,65$), galináceos ($\chi^2 = 0,15$, $p = 0,90$), cães no domicílio ($\chi^2 = 0,25$, $p = 0,61$), também não influenciaram o status de mudança na resposta imune celular.

Foi analisada, ainda, a mudança da resposta DTH considerando-se todas as quatro possibilidades. Os resultados não foram estatisticamente significativos com a possibilidade de positivar ou com a manutenção do teste negativo entre as duas avaliações, na quase totalidade de exposições estudadas, exceto pelo histórico de calazar prévio, conforme comentado anteriormente, o qual foi fortemente associado com a positivação do DTH na análise de seguimento (tabela 16).

Excluindo-se da amostra os casos de calazar prévio, que poderiam influenciar a análise, não foram encontradas diferenças significativas entre os fatores epidemiológicos estudados e a modificação da resposta DTH pelo estudo de coorte (tabela 17).

Tabela 15. Análises univariadas dos fatores epidemiológicos com a perda da resposta DTH pelo estudo de coorte

| Variáveis | Modificação da reação DTH na coorte | | | | Valor de <i>p</i> |
|--------------------------------|-------------------------------------|------------|--------------------|-----------|-------------------|
| | Mantenedores | | Perdedores | | |
| | Total ¹ | n* (%) | Total ² | n* (%) | |
| Demográficas | | | | | |
| Sexo masculino | 129 | 47 (36,4) | 24 | 10 (41,7) | 0,62 |
| Mudou de residência | 129 | 19 (14,7) | 24 | 3 (12,5) | 1,0 |
| Fatores individuais | | | | | |
| Sintomas clínicos recentes | 128 | 29 (22,7) | 24 | 6 (25) | 0,80 |
| Parasitoses (eosinofilia) | 119 | 104 (87,4) | 20 | 16 (80) | 0,47 |
| Vacinas nos últimos 6 meses | 126 | 28 (22,2) | 24 | 3 (12,5) | 0,41 |
| IMC alterado | 107 | 43 (40,2) | 18 | 5 (27,8) | 0,31 |
| Anemia | 118 | 21 (17,8) | 20 | 5 (25) | 0,44 |
| Exposição ambiental | | | | | |
| Moradia em casa de taipa | 129 | 20 (15,5) | 24 | 3 (12,5) | 1,0 |
| Residência próxima a vegetação | 129 | 122 (94,6) | 24 | 24 (100) | 0,60 |
| Animais no peridomicílio | 129 | 107 (82,9) | 24 | 19 (79,2) | 0,65 |
| Galináceos no peridomicílio | 129 | 77 (59,7) | 24 | 14 (58,3) | 0,90 |
| Cães no domicílio | 129 | 68 (52,7) | 24 | 14 (58,3) | 0,61 |

¹ Total de mantenedores da resposta DTH na variável analisada.

² Total de perdedores da resposta DTH na variável analisada.

n* Numero de respostas afirmativas

Tabela 16. Análises univariadas dos fatores epidemiológicos estudados com a modificação da resposta DTH pelo estudo de coorte

| Variáveis | Variação do DTH na coorte | | | | Valor de <i>p</i> |
|---|---------------------------|-------------|------------|-------------|-------------------|
| | total de respostas n (%) | | | | |
| | Positivos | Positivaram | Negativos | Negativaram | |
| Sexo masculino | 64 (41,0%) | 44 (49,4%) | 22 (35,5%) | 10 (41,7%) | 0,37 |
| Sintomas há 15 dias | 31 (20,0%) | 19 (21,6%) | 17(27,4%) | 6 (25,0%) | 0,67 |
| HAS | 17 (10,9%) | 8 (9,0%) | 3 (4,9%) | 0 (0,0%) | 0,21 |
| Diabetes | 3 (1,9%) | 3 (3,4%) | 2 (3,3%) | 0 (0,0%) | 0,73 |
| Calazar prévio | 27 (17,3%) | 24 (27,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0,001 |
| Vacinações últimos 6 meses | 28 (18,3%) | 11 (12,5%) | 9 (15,0%) | 3 (12,5%) | 0,39 |
| Residência de taipa | 23 (14,7%) | 14 (15,7%) | 9 (14,5%) | 3 (12,5%) | 0,98 |
| Residência próxima a vegetação | 145 (92,9%) | 80 (89,9%) | 55 (88,7%) | 24 (100,0%) | 0,30 |
| Animais no peridomicílio | 129 (82,7%) | 67 (75,3%) | 50 (80,6%) | 19 (79,2%) | 0,57 |
| Cães no domicílio | 80 (51,3%) | 48(53,9%) | 33 (53,2%) | 14 (58,3%) | 0,92 |
| Galinhas no peridomicílio | 95 (60,9%) | 45 (50,6%) | 38 (61,3%) | 14 (58,3%) | 0,41 |
| Cães aspecto doente próximo a residência | 108 (69,2%) | 61 (68,5%) | 43 (69,4%) | 20 (83,3%) | 0,53 |
| Cão com sorologia positiva no domicílio | 29 (63,0%) | 10 (50,0%) | 3 (33,3%) | 3 (50,0%) | 0,36 |
| Eosinófilo elevado | 126 (86,3%) | 72 (84,7%) | 44 (81,5%) | 16 (80,0%) | 0,79 |
| Alteração IMC presente | 50 (39,4%) | 17 (23,0%) | 14 (27,5%) | 5 (27,8%) | 0,086 |

Tabela 17. Análises univariadas dos fatores epidemiológicos com a modificação da resposta DTH pelo estudo de coorte (sem casos de LV)

| Variáveis | Variação do DTH na coorte | | | | Valor de <i>p</i> |
|--|---------------------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| | total de respostas n (%) | | | | |
| | Mantiveram-se positivos | Positivaram | Mantiveram-se Negativos | Negativaram | |
| Sexo masculino | 47 (36.4%) | 30 (46.2%) | 22 (35.5%) | 10 (41.7%) | 0.54 |
| Sintomas há 15 dias | 29 (22.7%) | 11 (17.2%) | 17(27.4%) | 6 (25.0%) | 0.57 |
| HAS | 17 (13.2%) | 7 (10.8%) | 3 (4.9%) | 0 (0.0%) | 0.10 |
| Diabetes | 3 (2.3%) | 3 (4.6%) | 2 (3.3%) | 0 (0.0%) | 0.66 |
| Vacinações últimos 6 meses | 28 (22.2%) | 7 (10.9%) | 9 (15.0%) | 3 (12.5%) | 0.20 |
| Residência de taipa | 20 (15.5%) | 11 (16.9%) | 9 (14.5%) | 3 (12.5%) | 0.96 |
| Residência próxima a vegetação | 122 (94.6%) | 61 (93.8%) | 55 (88.7%) | 24 (100.0%) | 0.23 |
| Animais no peridomicílio | 107 (82.7%) | 48 (73.8%) | 50 (80.6%) | 19 (79.2%) | 0.51 |
| Cães no domicílio | 68 (52.7%) | 34 (52.3%) | 33 (53.2%) | 14 (58.3%) | 0.96 |
| Galinhas no peridomicílio | 77 (59.7%) | 33 (50.8%) | 38 (61.3%) | 14 (58.3%) | 0.61 |
| Cães aspecto doente próximo a residência | 88 (68.2%) | 44 (67.7%) | 43 (69.4%) | 20 (83.3%) | 0.49 |
| Cão com sorologia positiva no domicílio | 23 (62.2%) | 7 (53.8%) | 3 (33.3%) | 3 (50.0%) | 0.47 |
| Eosinófilo elevado | 104 (87.4%) | 54 (87.1%) | 44 (81.5%) | 16 (80.0%) | 0.65 |
| Alteração IMC presente | 43 (40.2%) | 16 (29.6%) | 14 (27.5%) | 5 (27.8%) | 0.31 |

4.10. Modelo logístico com resposta multinomial

Por esse modelo, foi avaliada a influência da condição familiar, quanto à presença de casos de LV, ou seja, se a família do indivíduo era caso (existe caso na família) ou controle (não existe caso na família), na variação ocorrida no status DTH no estudo coorte entre os dois momentos de avaliação.

No quadro 1, a razão de odds em negrito (1.96) mostra que a probabilidade de um indivíduo desenvolver uma resposta DTH positiva (mudar de negativo para positivo) é quase o dobro de negativá-la (mudar de positivo para negativo), desde que ele tenha alguém com calazar na família. O quadro é resultante do ajuste de um modelo logístico multinomial com correção sobre o tempo coorte, o qual variou de 2 a 10 anos com uma média de 7.72 e desvio-padrão 1.88.

Quadro1. Risco na mudança do status DTH do indivíduo no estudo coorte, em função da existência de casos de calazar na família, com correção sobre o tempo

| Variável/Efeito | Nível ^(*) Resposta | Estimativa β_j | p | Odds- Ratio | Lim.inf. | Lim.sup. |
|-----------------|----------------------------------|-------------------------|---------------|----------------|-------------|-------------|
| Intercept 1 | Positivo | 1.4795 | 0.0857 | 4.39 | 0.81 | 23.73 |
| Tempo coorte | | 0.0317 | 0.7895 | 1.03 | 0.82 | 1.30 |
| Type Fam(Caso) | | 0.2724 | 0.3304 | 1.31 | 0.76 | 2.27 |
| Intercept 2 | Positivaram | -0.1422 | 0.8802 | 0.87 | 0.14 | 5.51 |
| Tempo coorte | | 0.1371 | 0.2813 | 1.15 | 0.89 | 1.47 |
| Type Fam(Caso) | | 0.6745 | 0.0416 | 1.96 | 1.03 | 3.76 |
| Intercept 3 | Negativo | 1.3204 | 0.1515 | 3.74 | 0.62 | 22.75 |
| Tempo coorte | | -0.0910 | 0.4741 | 0.91 | 0.71 | 1.17 |
| Type Fam(Caso) | | 0.3385 | 0.2970 | 1.40 | 0.74 | 2.65 |

(*) Categoria base: Negativaram

4.11. Padrão de citocinas e quimiocinas produzidas por células mononucleares, após estimulação com antígenos de *L. infantum chagasi*, oriundas do sangue periférico dos indivíduos de acordo com resposta ao DTH

As análises do padrão das citocinas e quimiocinas, produzidas por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) oriundas dos entrevistados após estímulo antigênico, foi realizada de acordo com os grupos de resposta positiva ou negativa ao teste de Montenegro (DTH), pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. As citocinas IFN- γ ($p = 0,001$), TNF α ($p = 0,005$) e IL12 ($p = 0,003$), foram associadas significativamente com a positividade do DTH, conforme figura 19.

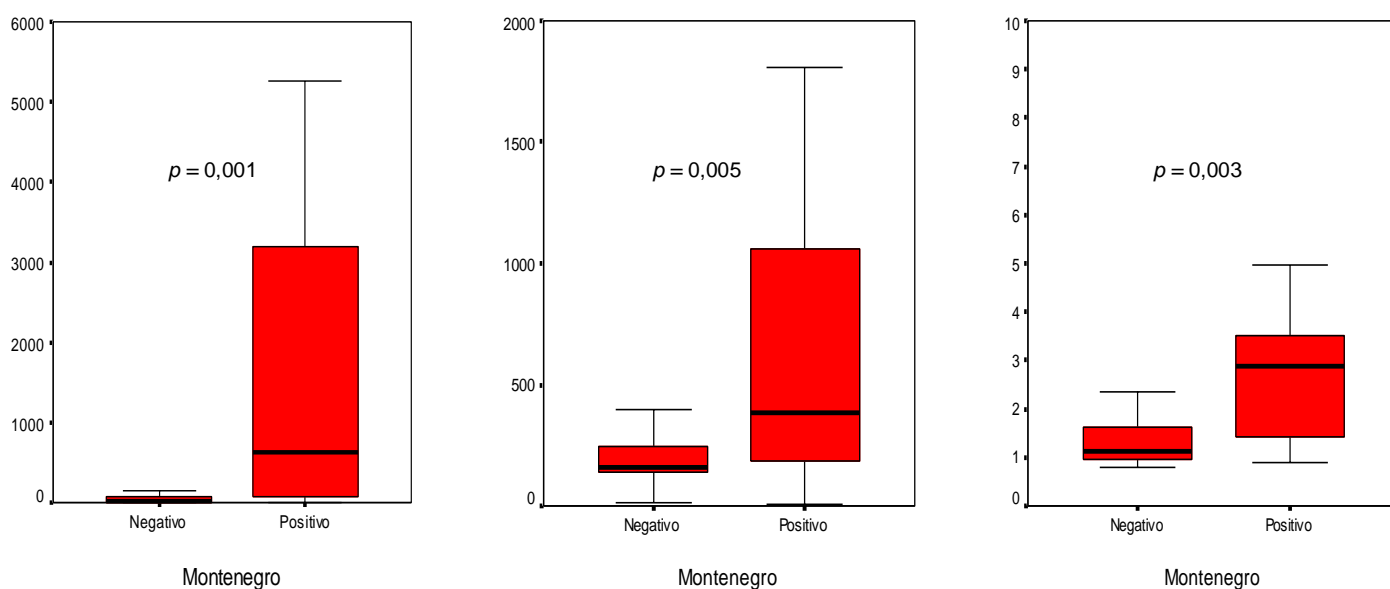


Figura 19. Gráficos de comparação das citocinas (pg/ml) IFN- γ , TNF α e IL12 produzidas pelas PBMCs após estímulo antigênico, de acordo com resposta ao DTH

De outro modo, as interleucinas IL4 ($p = 0,06$), IL 10 ($p = 0,14$), IL 6 ($p=0,79$) e IL 7 ($p = 0,50$) não se mostraram com diferença estatisticamente significativa entre os reatores positivos e negativos ao teste de Montenegro, como observado na figura 20.

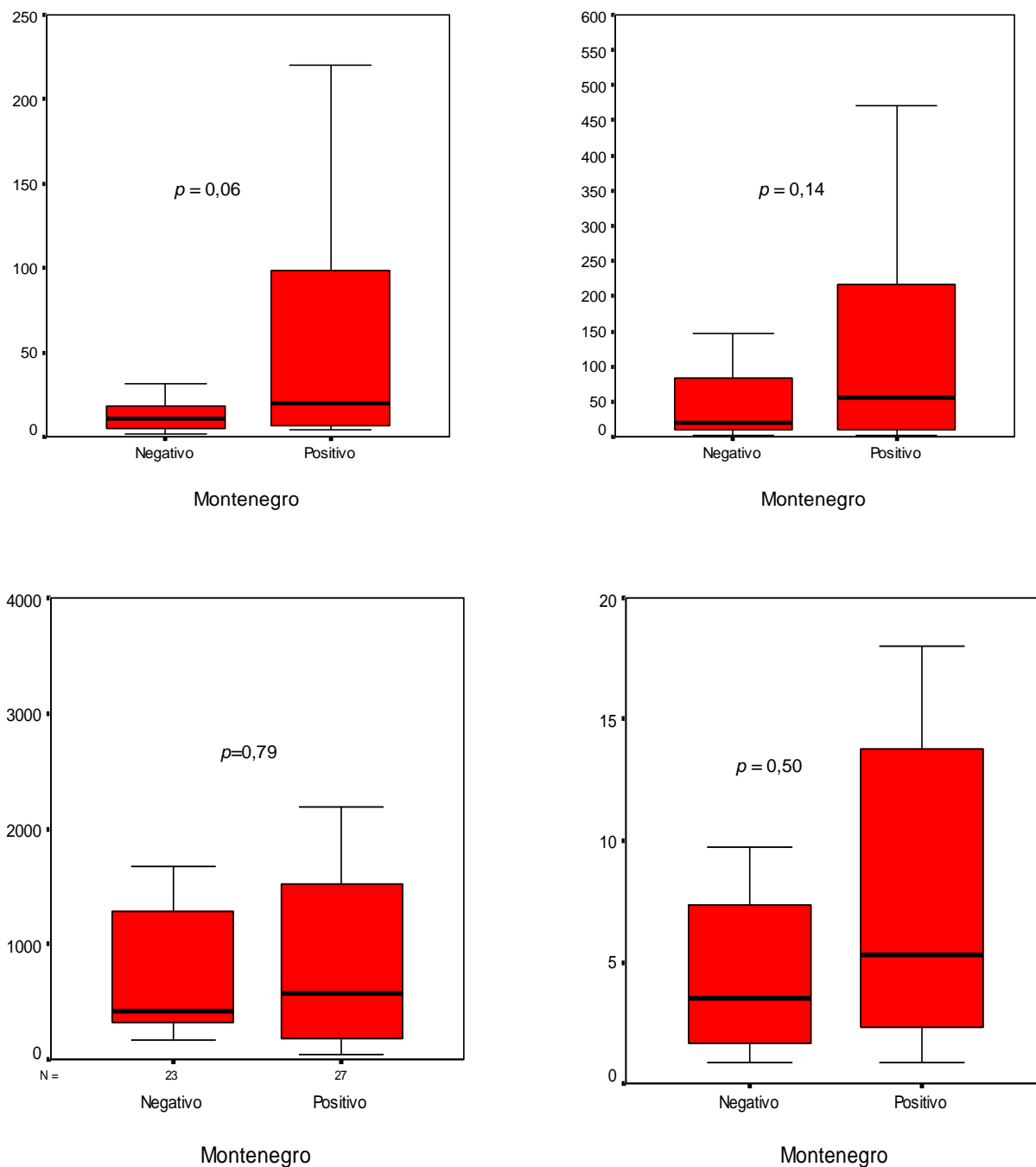


Figura 20. Gráficos de comparação das citocinas (pg/ml) IL4, IL10, IL6, e IL7 produzidas pelas PBMCs após estímulo antigênico, de acordo com resposta ao DTH

Quanto à produção de quimiocinas, produzidas pelas células mononucleares, pós-estímulo com antígeno de leishmania, as análises revelaram uma tendência de associação da CXCL9/MIG ($p = 0,054$) com os respondedores ao teste de Montenegro, enquanto que a CXCL10/IP-10 não mostrou diferença significativa ($p = 0,92$) entre os dois grupos estudados (figura 21).

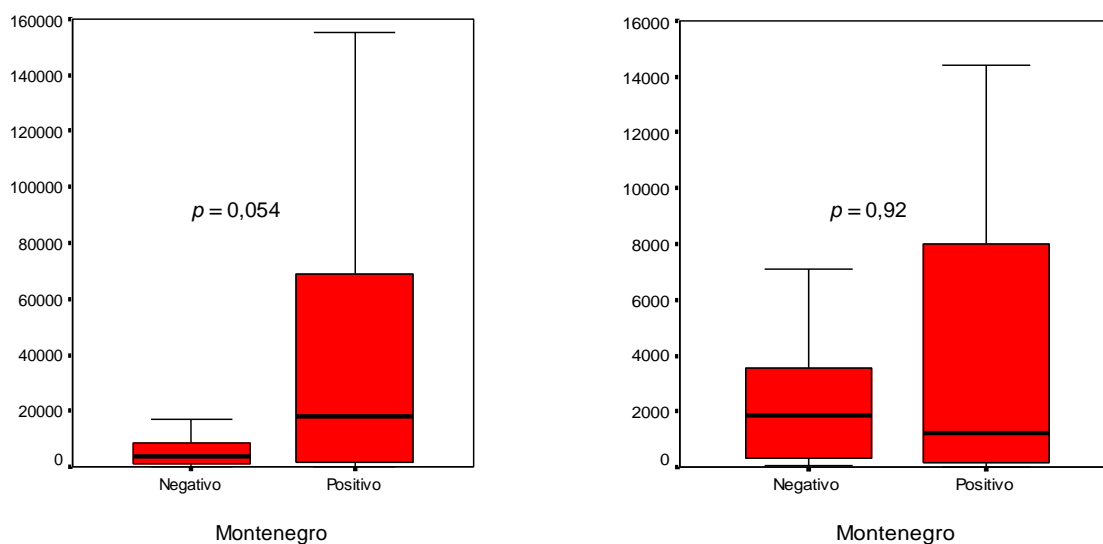


Figura 21. Gráficos de comparação das quimiocinas CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 produzidas pelas PBMCs após estímulo antigênico, de acordo com resposta ao DTH

4.12. Padrão de citocinas e quimiocinas produzidas por células mononucleares, após estimulação com antígenos de *L. infantum chagasi*, oriundas do sangue periférico dos indivíduos de acordo com variação ocorrida no status DTH e passado de leishmaniose visceral

Nessas análises, o padrão das citocinas e quimiocinas produzidas pelas PBMCs foi realizado em quatro grupos, de acordo com a variação ocorrida no status da resposta DTH, entre as duas visitas do estudo de coorte e nos indivíduos com histórico de LV pregressa pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os grupos constituídos foram: LV (histórico de LV pregressa), DTH + (DTH manteve-se positivo), DTH +/- (DTH mudou de positivo para negativo) e DTH-/- (DTH manteve-se negativo), conforme as figuras 22 e 23.

A citocina IFN- γ apresentou diferença significativa ($p = 0,01$) no grupo com histórico pregresso de LV em relação ao DTH-/- . TNF- α foi mais produzida pelos indivíduos com passado de LV e pelos mantenedores da resposta DTH ($p = 0,004$) em relação aos negativos (DTH-/-). Semelhantemente ao TNF- α , os níveis de IL12 tiveram diferença estatisticamente significativa ($p = 0,04$) no grupo com passado de LV e pelos mantenedores da resposta DTH em relação aos negativos. Entretanto, os níveis de IL6 foram mais elevados no grupo dos que perderam a resposta imune celular (DTH +/-) em comparação aos continuamente negativos (DTH-/-), com associação significativa ($p=0,024$).

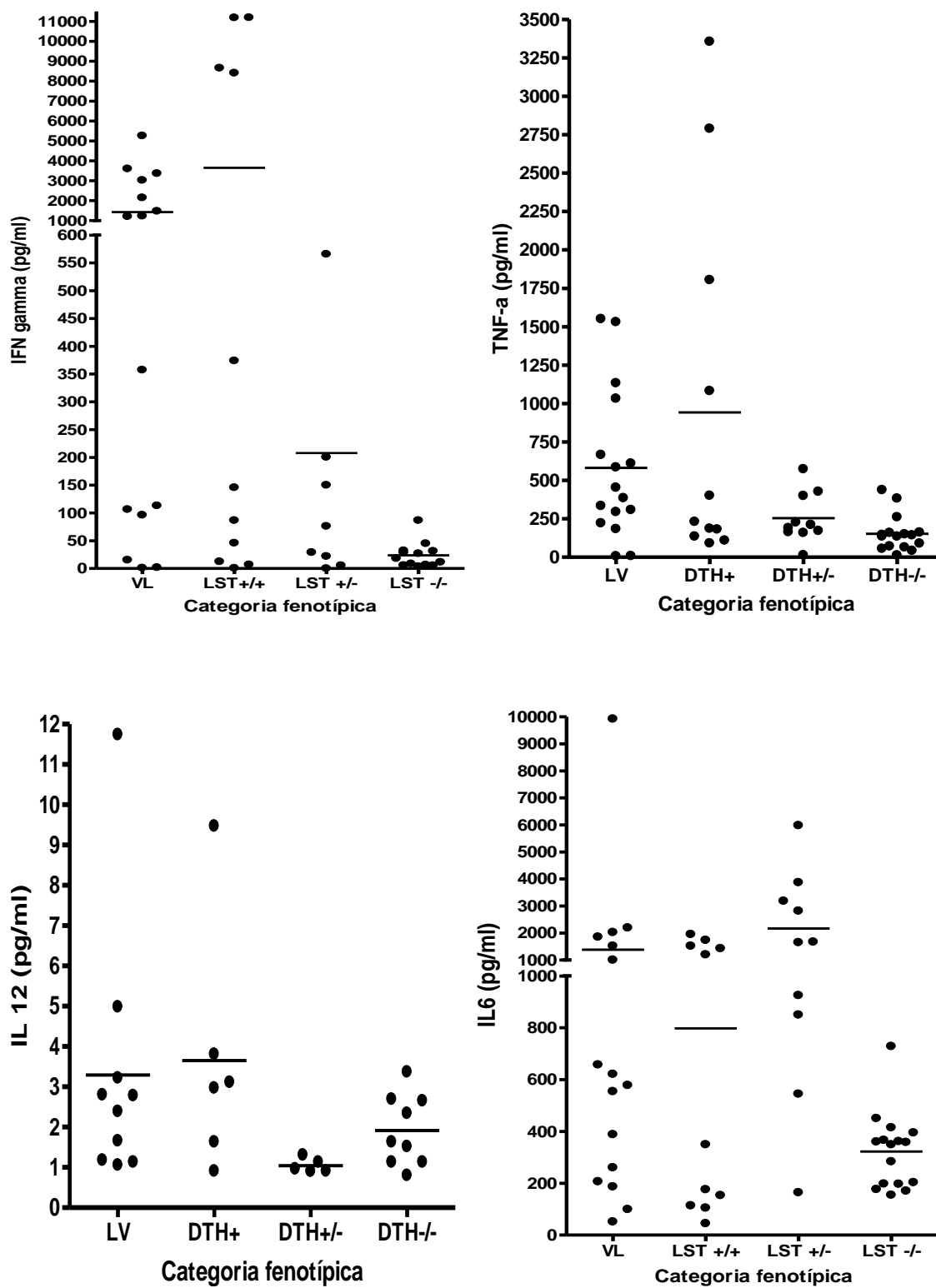


Figura 22. Gráficos de comparação das citocinas (pg/ml) IFN- γ , TNF α , IL12 e IL6, produzidas pelas PBMCs após estímulo antigênico, de acordo com variação ocorrida no status DTH e passado de LV

As interleucinas IL4 ($p = 0,31$), IL 10 ($p = 0,44$), IL 7 ($p = 0,26$) e as quimiocinas CXCL9/MIG ($p=0,29$) e CXCL10/IP-10 ($p=0,98$) não mostraram diferença nos níveis analisados entre os quatro grupos estudados (figura 23).

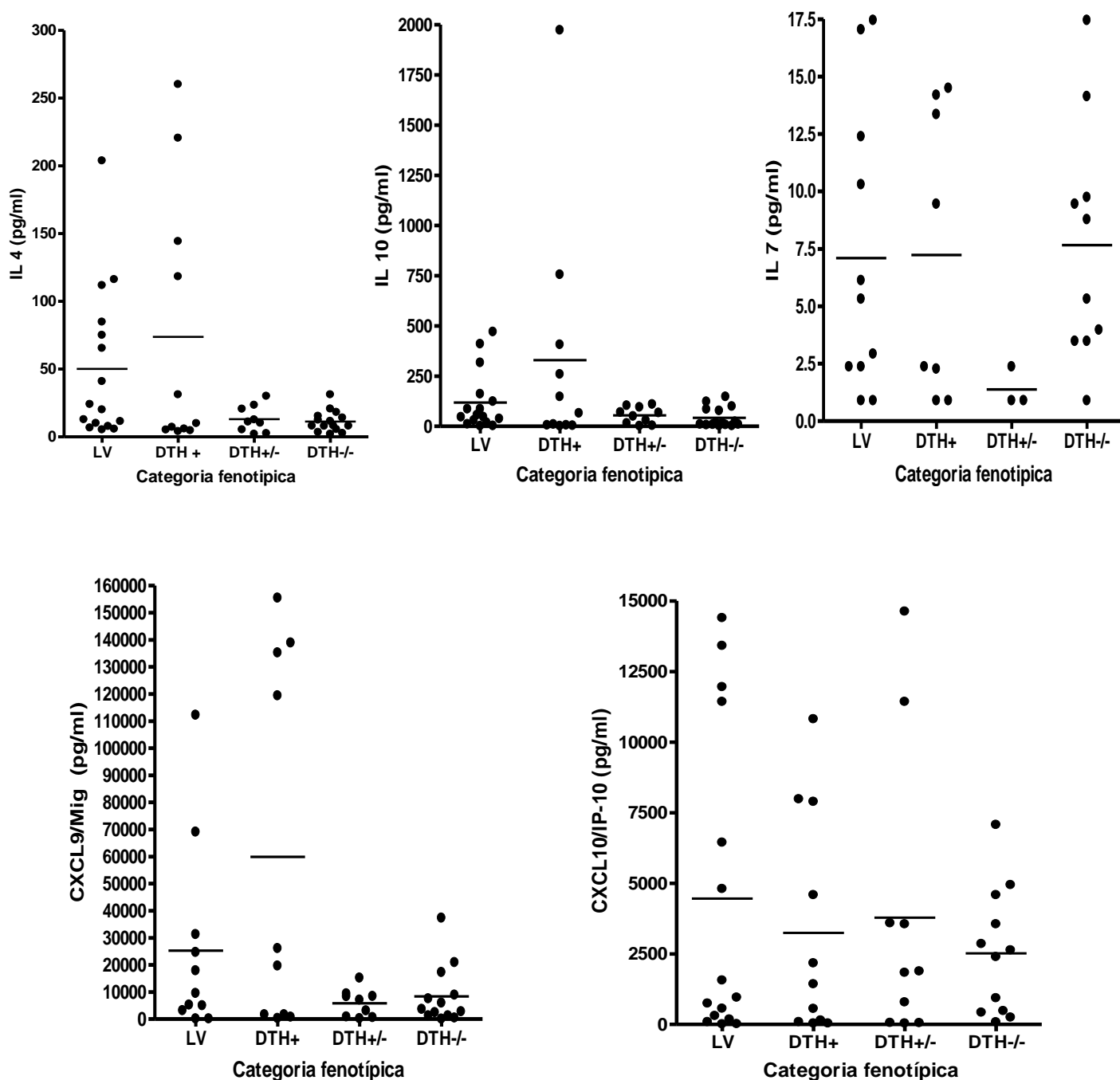


Figura 23. Gráficos de comparação das citocinas (pg/ml) IL4, IL 10, IL 7 e as quimiocinas CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 produzidas pelas PBMCs após estímulo antigênico, de acordo com variação ocorrida no status DTH e passado de LV

4.13. Padrão de citocinas e quimiocinas produzidas por células mononucleares, após estimulação com antígenos de *L. infantum chagasi*, oriundas do sangue periférico dos indivíduos sem história de LV, de acordo com a resposta DTH e a variação ocorrida no status na coorte

Considerando-se todas as pessoas sem história de LV, a quantidade de IFN- γ , TNF α e L12 liberada pelas células de indivíduos com uma resposta DTH positiva foi significativamente maior do que a quantidade delas nos indivíduos com DTH negativo (Quadro 2). Nenhuma diferença significativa na IL-4, IL-10, IL-6 ou IL 7 foi observada. O nível de IFN- γ foi diretamente correlacionado com o tamanho da indução DTH, (Spearman $r = 0,62$, $p = 0,0001$), Figura 24. Nenhuma das quimiocinas CXCL9/MIG ou CXCL10/IP-10 foi significativamente diferente entre pessoas DTH+ versus DTH-.

As alterações de citocinas e quimiocinas, de acordo com a mudança no estado do DTH na coorte, foram informativas. Nos indivíduos assintomáticos, mantenedores do DTH positivo, os valores de IFN- γ e TNF α foram significativamente mais elevados do que nos indivíduos controles, mostrando que as respostas imunes, antígeno específicas do tipo 1, eram detectáveis nesse grupo.

Notavelmente, os níveis de IL-6 foram maiores em indivíduos que negativaram o DTH do que em indivíduos que mantiveram o status estável ($p = 0,005$), Tabela 18. Os níveis de IL-6 produzida por PBMCs de indivíduos que permaneceram DTH negativos foram menores do que os dos indivíduos em todos os grupos no momento do segundo exame. Este maior nível de IL-6, nos indivíduos que converteram o DTH positivo para negativo, levanta hipóteses

sobre o envolvimento de fatores da resposta imune inata no “clearance” imunológico das infecções assintomáticas.

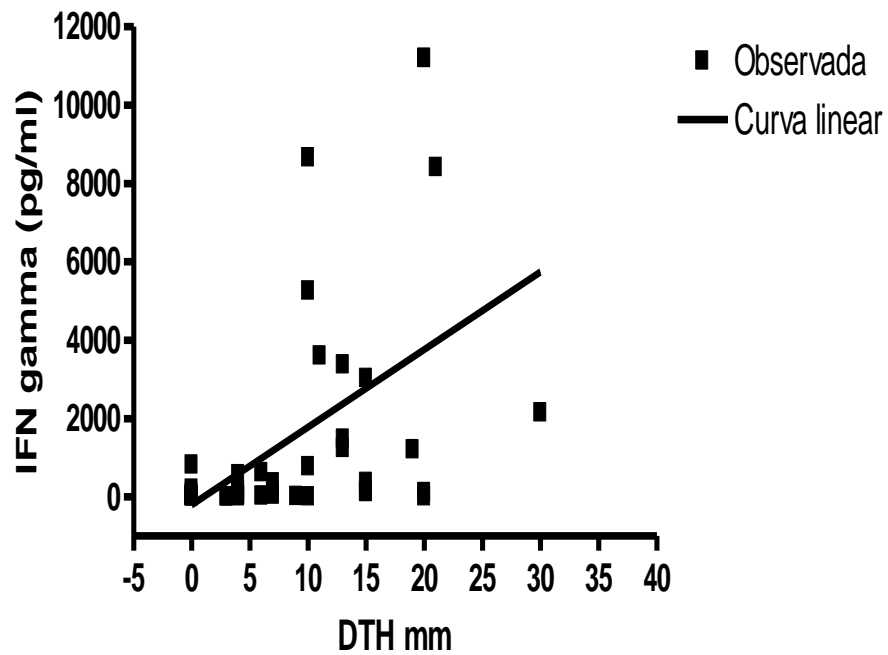


Figura 24. Curva linear entre DTH em mm e níveis de IFN- γ nos indivíduos assintomáticos

Quadro 2. Níveis de citocinas e quimiocinas liberadas por células mononucleares do sangue periférico, após estimulação com antígenos de *L. i. chagasi*, testadas na segunda visita da coorte, nos indivíduos sem histórico de LV. Valores são mostrados em mediana e intervalo de confiança de 90%

| Cito- cinas Pg/ml | Resposta DTH no seguimento | | | | | Variação do DTH na coorte | | | | | | |
|-------------------------|----------------------------|----|-----------------------|----|------------|---------------------------|----|------------------------|----|-----------------------|----|------------|
| | DTH+ | N | DTH- | N | P valor | +/+ | N | +/- | N | -/- | N | P valor |
| IFN- γ | 373.9 (0.7-11197.8) | 11 | 27.8 (0.7-781.2) | 22 | 0.03 | 377 (0.7-11197.9) | 11 | 76.3 (0.2-819.2) | 9 | 18.2 (3.5-86.73) | 13 | 0.04 |
| TNF α | 230.7 (90.6-3355.4) | 11 | 158.9 (12.8-525.7) | 26 | 0.05 | 230.7 (90.6-3355.4) | 11 | 200.8 (13.7-573.5) | 10 | 138.7 (12.4-436.9) | 16 | 0.017 |
| IL-12 | 3.0 (0.9-9.4) | 6 | 1.22 (0.8-3.4) | 14 | 0.02 | 3.0(0.9-9.5) | 6 | 0.9 (0.9-1.3) | 5 | 1.63 (0.8-3.4) | 9 | 0.02 |
| IL-10 | 64.7 (2.0-1972.7) | 11 | 22.7 (1.8-139.8) | 25 | 0.42 | 64.7 (2.0-1972.7) | 11 | 58.7 (1.8-109.7) | 10 | 15.7 (2.1-147.2) | 15 | 0.63 |
| IL-4 | 9.89 (4.0-260.1) | 11 | 10.6 (2.1-30.9) | 24 | 0.35 | 9.9 (4.0-260.2) | 11 | 11.1 (2.1-30.0) | 9 | 8.3 (2.-31.1) | 15 | 0.64 |
| IL-6 | 478.63 (44.9-1950.8) | 11 | 380.8 (158.2-5242.6) | 26 | 0.5 | 478.6 (44.9-1950.8) | 11 | 1661.8 (164.2-5982.13) | 10 | 353.7 (154.9-728.4) | 16 | 0.005 |
| IL-7 | 7.86 (0.9-18.0) | 8 | 3.9 (0.9-17.5) | 13 | 0.68 | 7.8 (0.9-18.0) | 8 | 0.9 (0.9-2.3) | 3 | 7.0(0.9-17.45) | 10 | 0.14 |
| IP10 | 1429.2 (37.5-11132.5) | 11 | 2136.1 (37.5-14143.6) | 22 | 0.87 | 1429.2 (37.6-11132.5) | 11 | 1854.6 (35.0-14623.0) | 10 | 2512.5(79.97-7073.3) | 12 | 0.97 |
| MIG | 22836.9 (298.8-155401.3) | 10 | 4783.2 (65.4-34802.5) | 22 | 0.11 | 22836.9 (298.8-155401.3) | 10 | 7040.5 (216.2-15193.8) | 9 | 3624.9 (38.8-37256.7) | 13 | 0.28 |

5. DISCUSSÃO

A infecção por *L. infantum chagasi* resulta num espectro de apresentações clínicas que vão desde infecção assintomática a doença ativa (leishmaniose visceral) caracterizada por febre, caquexia, hepatoesplenomegalia e imunossupressão (1). Nas formas assintomáticas ou subclínicas, há uma importante resposta proliferativa celular e teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) positivo ao antígeno de *Leishmania* (18-22;143), enquanto que, nas formas sintomáticas, o teste mostra-se negativo, devido à ausência da resposta de hipersensibilidade tardia, tornando-se posteriormente positivo, nos casos curados, em torno de um ano após o tratamento específico (177;178;187). Além do mais, o DTH tem se mostrado, nesses indivíduos, como um marcador de cura e resistência adquirida à doença (9;147;188-191).

No Brasil, até quase os anos sessenta, a leishmaniose visceral encontrava-se localizada em áreas agrícolas rurais e era caracterizada por casos esporádicos (12). Não obstante, nas últimas décadas, observa-se uma expansão surpreendente desde as pequenas cidades até as metrópoles (13-15). Nesse mesmo intervalo temporal, o Brasil sofreu uma dramática transformação na distribuição de sua população, decorrente de migração da população residente em área rural para área urbana, tendo ocorrido um aumento populacional de 350% na população urbana, nas quatro últimas décadas (16).

Por sua vez, a urbanização do país levou ao crescimento desestruturado das grandes cidades, onde faltam as condições sanitárias básicas e, como consequência, o acúmulo de lixo doméstico e ambiente rico em matéria orgânica, calor e umidade, propícios à proliferação do *Lu. Longipalpis*, que hoje se adapta aos ambientes peridomiciliares (33). Pelo exposto, vemos que nas grandes cidades são

criadas condições para que haja uma evolução natural da infecção, favorecedora à formação de um grande contingente de indivíduos apresentando a forma assintomática, mensurada pelo DTH (18-22). Entretanto, ainda não se sabe bem ao certo qual o significado dessa interação parasita-hospedeiro e qual a exata implicação que recursos terapêuticos e doenças imunossupressoras do mundo moderno têm no impacto do desenvolvimento das formas sintomáticas ou graves da LV.

A leishmania possui parasitismo dependente da capacidade de evasão de ambos os sistemas imunes (inato e adaptativo). Com esse processo de urbanização, ela torna-se um importante agente de infecção oportunista nos pacientes com AIDS, onde essa coinfeção tem se apresentado com formas clínicas bastante diversificadas e casos com evolução progressiva fatal, além de recaídas pós-tratamento (25). No meio urbano, como já observado no estado do Rio Grande do Norte (26;27), a sobreposição das áreas de ocorrência de LV com áreas de pacientes imunossuprimidos, como HIV/AIDS, renais crônicos e os transplantados, nos alerta para riscos futuros de forte impacto no perfil clínico e epidemiológico dessas doenças.

Todavia, faltam dados consistentes sobre os fatores determinantes que levam à cura clínica pós-infecção com manutenção ou perda da resposta ao DTH para antígenos de *L. infantum chagasi* ao longo do tempo. Esses achados são cruciais para a compreensão da relação do parasito com o hospedeiro e de quais são os parâmetros imunes que podemos inferir como sendo de risco para o desenvolvimento da doença. Assim, a proposição deste estudo foi avaliar o entendimento da resposta imune à leishmania e identificar os fatores condicionantes da manutenção da resposta ao DTH em indivíduos com história de infecção por *L.*

infantum chagasi em áreas endêmicas e averiguar se a manutenção ou perda do DTH é associada com citocinas do tipo Th1 e/ou Th2.

No presente estudo, a positividade ao DTH foi encontrada em todos os 51 indivíduos (100%) com diagnóstico de calazar anterior, resultado que confirma observações já descritas por outros estudos, principalmente no Brasil, que encontraram positividade variando de 70 a 100% em pacientes tratados (21;128;147;174;192). Nenhum dos nossos pacientes teve recaída da doença, e o tempo entre o tratamento e a manutenção da positividade do DTH foi de até 14 anos. Além disso, 10 indivíduos da coorte, inicialmente DTH negativos, desenvolveram LV durante o estudo. Todos os 10 converteram para DTH positivo após a cura clínica, o que mostra que o teste é um excelente marcador da resposta imune celular pós-cura clínica em nosso país.

O teste DTH brasileiro (Montenegro) é uma preparação padrão feita de acordo com as normas GMP ("Good Manufacturing Practice") a partir de antígenos *L. amazonensis*, que é um marcador confiável para respostas do tipo 1 a todas as *Leishmania spp.* prevalentes no país. Fato contrário foi observado na Índia, onde o teste cutâneo revelou baixa sensibilidade em pacientes curados e perda da sensibilidade ao longo dos anos, especialmente quando utilizados antígenos de espécies de *Leishmania* diferentes da *L. donovani*, causadora de LV naquele país, mostrando a necessidade de padronização local (24;28).

Observou-se positividade ao teste de Montenegro maior naqueles com idade mais avançada, corroborando com o que já foi constatado em estudos progressos (19;20;177;178), além de encontrar-se maior tamanho de endureção nessa faixa etária. Da mesma forma, a manutenção da resposta ao antígeno de leishmânia ao longo do tempo se mostrou dependente da idade. Esses achados se devem,

provavelmente, à reexposições por maior tempo, com estímulo constante à imunidade nesses indivíduos que se mantêm nas áreas de transmissão do parasita. Outra explicação seria pelo fato de os adultos possuírem resposta mais eficaz que às crianças, o que explica a prevalência da faixa etária infantil entre os casos de calazar nas regiões endêmicas (9;27;50;72;128).

A predominância de resposta DTH positiva não foi afetada de forma significativa quanto ao sexo e ambos foram infectados igualmente, confirmando observações anteriores de infecção assintomática por *L. infantum chagasi* na região (21). Esse estudo mostrou, ainda, que a taxa de LV é de 5 homens para 1 mulher após os 10 anos de idade; no entanto, abaixo de 10 anos, não há diferença no acometimento de doença entre os sexos. Esses achados dão suporte às evidências de que a infecção por leishmânia ocorre no ambiente domiciliar, e que fatores característicos do sexo não influenciam o controle do parasitismo, apesar de ele ser determinante em relação ao risco de desenvolver a LV sintomática na população adulta.

Possíveis alterações imunes, decorrentes de infecções e vacinações recentes, prováveis parasitoses e presença de comorbidades crônicas, como hipertensão e diabetes, não foram fatores influenciadores da resposta à intradermorreação de Montenegro, indicando que a resposta à leishmânia, pode não ser modulada por outros estímulos ou doenças crônicas. Entretanto, o número amostral de portadores de comorbidades foi pequeno, com 28 indivíduos (8,5%) apresentando algum antecedente patológico e 25 (7,6%) vacinadas recentemente, mostrando, assim, a necessidade de novos estudos com metodologia mais direcionada para tais objetivos.

Da mesma forma, parâmetros nutricionais não se mostraram determinantes na resposta imune a antígenos de leishmânia em indivíduos assintomáticos, ao contrário do que é encontrado nos casos de calazar, em que são condição de risco para o desenvolvimento das formas sintomáticas (193;194). Mesmo ao analisarmos apenas a faixa etária infantil esses parâmetros nutricionais permaneceram sem associação significativa com a resposta DTH. Entretanto, talvez fossem necessárias outras análises nutricionais, além do índice de IMC e presença de anemia, como mensuração de dosagens de proteínas e nutrientes sanguíneos para melhor avaliação do status nutricional dos indivíduos, conforme estudo realizado em crianças assintomáticas na mesma região em que se demonstrou que o tempo de amamentação foi associado com um aumento da probabilidade de positividade do Montenegro (194).

Chama ainda a atenção, quanto aos parâmetros nutricionais, o encontro de quase um terço da população estudada está acima dos níveis de IMC, considerados normais para o sexo e a idade, apesar de ser de baixa renda. Dados do IBGE mostram que, em nosso país, a frequência do excesso de peso na população já supera em oito vezes o déficit de peso entre as mulheres e em quinze vezes nos homens. Em todas as faixas de renda e em todas as regiões, o padrão de evolução do perfil antropométrico nutricional da população vem se repetindo e mostra a mudança dos hábitos alimentares “modernos”, de se consumirem muitos alimentos com alto teor de açúcar, principalmente refrigerantes, e poucas quantidades de frutas e hortaliças (16).

Variáveis indicativas de síndrome metabólica, tais como hipertensão, diabetes, circunferência abdominal e relação cintura-quadril, não foram associadas com mudança da resposta DTH. Contudo, trabalhos já demonstram a participação

de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL8 na gênese dessa síndrome (195). Estudos têm recentemente observado relações entre várias doenças infecciosas, como infecções crônicas virais e bacterianas, com diferentes aspectos da síndrome metabólica (196), mas faltam dados com relação às doenças parasitárias e, portanto, são necessários novos estudos.

As condições domiciliares investigadas não se mostraram positivamente correlacionados com a resposta DTH, ao contrário do que foi observado nos casos de infecção aguda por leishmânia, detectados por sorologia positiva, em que foi encontrada a associação com residências com chão de barro e/ou paredes de barro (197).

A presença de animais no domicílio, que pudessem servir de fonte de alimentação aos flebotomíneos, principalmente os galináceos, e a presença de reservatório canino, mais especificamente os cães soropositivos não foram relacionados com a positividade da reação. Tal achado confirma estudos anteriores (21;197), realizados na região, onde a posse de cães ou de outros animais, bem como a presença domiciliar de cães infectados não foram associadas com a infecção quando analisados os indivíduos e seus domicílios. Contrariamente, ao se analisarem os aglomerados populacionais da região, observa-se que a presença dos cães e de outros animais na vizinhança estavam associados com um risco aumentado de infecção por *L. infantum chagasi* (197). Essa não significância das análises quanto a cães soropositivos no domicílio poderia ser explicada pelo hábito de eles ficarem soltos no ambiente extradomiciliar, nessas áreas de periferia urbana, servindo de reservatório a todos, ou ainda a necessidade de observar-se a verdadeira importância do cão na cadeia de transmissão, como já aventado por outros estudos (72-74). Além disso, convém lembrar que os flebotomíneos possuem

autonomia de voo de até 1.000m (52;53), o que torna vários residentes expostos, independentemente da presença de animais em suas casas.

A presença de casos de calazar no ambiente domiciliar se mostrou como fator determinante da mudança da resposta DTH nos indivíduos assintomáticos, pois a probabilidade de um indivíduo positivar o DTH foi quase o dobro de negativar, desde que haja alguém com calazar na família. Tal observação foi feita em estudo prospectivo em área endêmica no vizinho estado do Ceará, onde residentes de um domicílio com um caso anterior de leishmaniose visceral tinham um risco de infecção aumentado em três vezes (9). Esses dados sugerem que existem fatores no mesmo ambiente que propiciam a infecção por leishmânia, como já demonstrado (198;199), mas que não foram identificados por este estudo, visto que não há associação entre fatores ambientais com positividade do DTH, comparando-se com outros padrões de variação ou manutenção de resposta na análise da coorte. Assim, esse achado beneficiaria a hipótese de que alguns indivíduos dessas famílias teriam determinantes genéticos favorecedores de evolução para doença e outros desenvolveriam resolução para cura.

A aquisição e manutenção da resposta DTH, observada naqueles com passado de leishmaniose visceral, reforçam convenientemente a ideia de que, nessa população, poderia não haver cura parasitológica, no qual a manutenção da resposta imune protetora e a imunidade de longa duração dependeriam da continuação da presença dos parasitas. Uma mudança no perfil de resistência para susceptibilidade seria, portanto, favorecida pelo clareamento dos parasitas, e a imunidade induzida pela infecção seria perdida, mostrando, assim, a importância da persistência dos parasitas para a memória imune antileishmânia, conforme já sugerido (123-126). É provável que a recuperação da imunidade pós-tratamento e a

elevada carga parasitária sofrida durante a doença sejam fatores determinantes na manutenção da memória imune por longo tempo. Esse fato explicaria por si o achado de uma maior resposta imune celular, medida pela intrademorreação, nessa população de curados pós-tratamento.

Do mesmo modo, semelhante inferência pode ser realizada ao analisar-se a intrademorreação na população de indivíduos assintomáticos. A perda da resposta DTH (15,7%) nesse subconjunto não foi associada a fatores ambientais ou individuais de comorbidades e nenhum dos retroconversores desenvolveu LV sintomática. Logo, isso levaria a questionar-se se haveria, nesses casos, um completo clareamento dos parasitas pelo sistema imune, corroborado pelos maiores níveis de IL-6 nesse grupo, acarretando a perda da memória imune ou se não há reexposição à leishmânia, cujos fatores de risco não foram detectados por este estudo, o que leva a manutenção ou reaquisição dessa resposta.

Há ainda indivíduos residentes na região endêmica e que apresentam uma resposta DTH permanentemente negativa não associada aos fatores estudados. É possível que essas pessoas nunca tenham sido picadas por flebotomíneos carregando leishmânias. Alternativamente, seguindo ainda o arrazoado anterior, elas podem ter sido expostas, mas eliminaram os parasitas rapidamente através de mecanismos da resposta imune inata e nunca desenvolveram resposta das células T do tipo 1, o que os levaria a um DTH positivo. Uma terceira possibilidade é que eles tenham desenvolvido e, posteriormente, negativado o teste cutâneo de Montenegro ao longo do tempo.

Neste estudo, demonstra-se que o teste de Montenegro realmente parece ser um marcador de imunidade celular para infecção por leishmânias. Células mononucleares, estudadas no grupo dos reatores, produziram significativamente

citocinas, após estímulo antigênico, do padrão Th1, como IFN- γ , TNF α e IL12 (2;5;101) e ainda apresentaram níveis da quimiocina CXCL9/MIG, que é demonstrada como importante partícipe no controle da infecção (3), com tendência de significância ($p = 0,054$).

Essas citocinas, consideradas pró-inflamatórias e efetoras na evolução para cura dos pacientes infectados, também obtiveram níveis significativamente elevados no grupo de participantes com passado de LV e naqueles que mantiveram a resposta DTH ao longo do tempo, comparando-se com os que perderam a resposta e os não expostos. Isso reforça a ideia de que indivíduos com um teste de Montenegro positivo possuem resposta imune protetora contra a evolução para as formas sintomáticas da infecção por *L. infantum chagasi*. Ela também levanta a possibilidade de que citocinas tipo 1, produzidas em resposta aos antígenos de leishmânia, poderiam servir como um marcador de imunidade protetora em ambientes onde os testes DTH não estão disponíveis (por exemplo, EUA) ou não são viáveis (por exemplo, mulheres grávidas). De outro modo, nesses grupos as quimiocinas CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 não se mostraram em níveis estatisticamente diferentes dos perdedores da resposta DTH ou dos permanentemente negativos, observação que talvez tenha ocorrido pela necessidade de um maior tamanho amostral, já que as medianas das dosagens dessas quimiocinas foram mais elevadas nos grupos LV e DTH+/+.

Por fim, achou-se que células mononucleares do subconjunto de indivíduos DTH positivos, que se tornaram DTH negativos ao longo do tempo (DTH+/-), produziram níveis mais elevados de IL-6 em resposta aos antígenos solúveis de leishmânia. Estudos experimentais têm demonstrado que as células da medula óssea deficiente de IL-6 não protegem contra leishmânia in vivo (111), e

camundongos IL-6 deficientes têm uma resposta linfocítica inadequada quando desafiados contra antígenos vacinais (200). De forma consistente, estes resultados sugerem um papel potencial para IL-6 na proteção contra o desenvolvimento de LV sintomática e aventam a idéia de que os mecanismos de resposta imune inata podem ser mais eficazes do que outros em estudo.

6. CONCLUSÕES

- 6.1.** Maior estímulo antigênico, caracterizado pelo adoecimento prévio, bem como a probabilidade de reexposições ao longo do tempo, relacionados com a idade, são fatores que estão associados com a resposta imune antileishmânia.
- 6.2.** A mensuração do DTH, obtida pela intradermorreação de Montenegro, é um marcador de imunidade e controle da infecção por *L. infantum chagasi* e se mantém, ao longo do tempo, na grande maioria dos previamente positivos.
- 6.3.** A presença pregressa de casos de calazar no ambiente domiciliar é fator determinante na positivação da resposta DTH nos indivíduos previamente negativos.
- 6.4.** A presença do reservatório canino e de outros animais no peridomicílio não foi relacionada com positividade do Montenegro, quando analisados os indivíduos. Entretanto, ao se analisarem os aglomerados populacionais da região e a presença dos cães e de outros animais na vizinhança, houve um risco aumentado de infecção por *L. infantum chagasi*.
- 6.5.** Fatores relacionados ao sexo, alterações imunes, decorrentes de infecções e vacinações recentes, prováveis parasitoses, comorbidades crônicas, parâmetros nutricionais e condições domiciliares não foram influenciadores da resposta ao teste de Montenegro.

- 6.6.** Uma resposta positiva ao teste associa-se com a produção imune de citocinas do padrão protetor Th1, o que classifica a resposta DTH positiva como um fenótipo em relação à evolução do hospedeiro diante da infecção pela *L. infantum chagasi*.
- 6.7.** Citocinas do tipo 1, produzidas em resposta aos antígenos de leishmania, poderiam servir como um marcador de imunidade protetora em ambientes onde os testes DTH não estão disponíveis.
- 6.8.** A perda da resposta DTH é associada com produção de IL-6, mostrando que a resposta imune inata pode favorecer a cura parasitológica para a infecção por *L. infantum chagasi*.

7. APÊNDICES

7.1. Questionário

Data ____|____|____

Coordenadas: |_____| |_____|

Família:|_____| Cadastro |_____|

Nome |_____| cadastro |_____|

Pai |_____| cadastro |_____|

Mãe |_____| cadastro |_____|

Endereço|_____|No_____|

Bairro:|_____| Cidade:|_____|

Fone:|_____|

FNS:Casa:____Quadra:____Ponto de Referência:|_____|

Checagem de identificação.(Nome completo com Identificação e RG)_____| Idade:

____| DATA DO NASCIMENTO: ____/____/____

(0=NÃO, 1=SIM)

DE ACORDO: 1. COLETA SANGUE []; 2. TESTES INTRADÉRMICOS []

SANGUE COLETADO? []; VOLUME [|] ml

LEITURA DOS: TESTES INTRADÉRMICOS ? []

INTERCORRÊNCIAS ? [] SE SIM INDICAR:

|_____|

|_____|

PENDÊNCIAS:

|_____|

Outros:

|_____|

Cadastro |__|__|__|__|__|__| Sexo |__| (M ou F), Idade: _____ DN__/_/____

Tempo de Moradia |__|__|anos e |__|__| meses. Mudou de residência? |__|

No de pessoas residentes no domicílio. |__|__|

CO-INFECÇÃO (0=não, 1=sim, não sabe=8)

Queixas nos últimos 15 dias? |__| Quais? |__|Febre, |__|Perda de peso, |__|Anorexia,
|__|Tosse, |__|Dor muscular, |__|Diarréia

Outro(s)_____

Exame físico alterado? |__| Qual

alteração?_____

Procurou assistência médica |__|, Qual (is) diagnostico(s)

dado(s)_____

Usou antibióticos? |__|, Se sim qual

(is)_____

CO-MORBIDADES

|__|HAS, |__|ICC, |__|Diabetes, |__|Tuberculose, |__|Hipotireoidismo,
|__|Gravidez,

|__|AIDS, |__|Hanseníase, |__|Helmintíase, |__| Desnutrição aparente.

|__|Neoplasia; Qual_____ Faz quimioterapia atualmente?|__|, Qual?_____

Doença reumática? |__| Qual?_____ Usa Corticoide sistêmico? |__| Qual? _____

EXPOSIÇÃO A ANTÍGENO

Possui cartão ? |__| Data do BCG ___/___/___

Fez teste antigênico na pele nos últimos 6 meses? |__| Qual? |__|PPD, |__|DTH, |__|Candidina,

Outros _____

Recebeu vacina nos últimos 6 meses |__| Qual?: |__|Sarampo, |__|doses; |__|Pólio, |__|doses;

|__|Febre amarela; |__|Tétano, |__|doses; |__|Hep B, |__|doses; |__| Gripe. Outras

:_____

FATORES DE RISCO DE EXPOSIÇÃO AO FLEBOTOMÍNEO

Tipo de moradia? Taipa|__|, Alvenaria|__|, Madeira|__|, Mista|__|

Mora em residência próximo a área de vegetação ? |__|

Se sim quantos metros aproximadamente ? |__| < 50, |__| 50 a 500, |__| 500 a 1000,

|__| > 1000m.

Possui animais no peridomicílio? |__| Se sim quais? Galinhas |__|, Numero |__|__|__|

Cães |__|, Numero |__|__|,

Caprinos |__|, Numero |__|__|,

Suíños |__|, Numero |__|__|,

Ovinos |__|, Numero |__|__|, Possui galinheiro em casa? |__| Distância (m)_____

OUTROS_____

FATORES DE RISCO A REINFECÇÃO POR LEISHMANIAS (NOTIFICAÇÃO PELA FNS OU SMS)

Visualizou cães, aparentemente doentes, nas proximidades da casa nos últimos seis meses?

Foi notificada, nos últimos seis meses, a presença de cão com calazar em sua casa?

Se sim quando? meses ou dias

Foi notificada, nos últimos seis meses, a presença de cão com calazar na vizinhança?

Se sim quando? meses ou dias

Foi notificada, nos últimos seis meses, presença de mosquito do calazar em sua casa?

Se sim quando? meses ou dias

Possui casos de calazar confirmado nos últimos seis meses em casa?

Se sim quando? meses ou dias

Possui casos de calazar confirmado nos últimos seis meses na vizinhança?

Se sim quando? meses ou dias

Coleta de Flebotomíneos (0=não, 1=sim) Total Machos Fêmeas

INVESTIGAÇÃO NUTRICIONAL

Peso habitual kg Refere perda de peso nos últimos 6 meses ?

Submete-se a alguma dieta ou mudança alimentar?

Se sim a quanto tempo? meses

Se sim qual tipo ? _____

PROCEDIMENTOS (0=NÃO, 1=SIM).

PA _____x_____mmhg

Exame físico alterado ? Qual alteração _____

Peso Atual: _____kg Altura _____m _____cm., IMC_____

Pregas :tríceps _____, subescapular _____, suprailíaca _____, abdominal _____

Diâmetro cintura cm, Diâmetro do quadril cm

Montenegro 48/72h mm PPD 48/72 mm

Montenegro anterior mm Ano de realização

CÃES: _____ N° _____

_____ N° _____

_____ N° _____

7.2. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Centro de Biociências
Departamento de Bioquímica
Laboratório de Imunogenética

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Determinantes de doença na leishmaniose visceral (CALAZAR)

Pesquisadores: Selma M.B. Jeronimo, Eliana T. Nascimento, Hênio G. Lacerda, Edgar Carvalho, Richard D. Pearson, Mary E. Wilson, Paula V. Queiroz, Iraci Duarte.

EXPLICAÇÃO SOBRE OS OBJETIVOS DO ESTUDO

Estamos convidando você para continuar participando, como voluntário, na pesquisa que tem como objetivo estudar a doença conhecida como calazar. Esta parte do estudo tem como objetivo avaliar sua defesa contra o germe que causa o calazar. O exame que iremos realizar é denominado teste de Montenegro, sendo realizado na pele do braço. O teste de Montenegro positivo significa que você foi infectado com *Leishmania*, o germe causador do calazar, mas seu organismo conseguiu com sucesso controlar a infecção. O teste de Montenegro positivo indica que você está protegido, e provavelmente não irá desenvolver a doença. No nosso estudo anterior, observamos que algumas pessoas permaneceram mais tempo com o teste de Montenegro positivo do que outras. Não sabemos a razão porque somente algumas pessoas perdem, com o tempo, a resposta ao teste de Montenegro e queremos descobrir se as pessoas que negavam o teste possuem maior facilidade de desenvolverem o calazar e quais os fatores que levam as pessoas a continuarem imunes (protegidas). Para isto, iremos realizar uma avaliação sobre o seu estado de saúde e realizar alguns exames, incluindo avaliação nutricional e infecção por germes que podem alterar a defesa, como o vírus HIV.

Examinaremos também os animais presentes na sua residência e iremos coletar o inseto transmissor da leishmania, conhecido como inseto palha. Faremos um mapeamento da sua residência, através de um aparelho que identifica as coordenadas geográficas. Coordenadas geográficas são linhas que determinam a posição de um local na terra. Esse registro será feito através de uso de um aparelho (GPS) que capta sinais vindos de satélites circulantes em volta da Terra.

Para realizar estes estudos, pedimos permissão para visitá-lo duas vezes por ano, durante 3 anos. Se você for o pai ou a mãe ou o guardião legal de um menor que esteja sendo convidado a participar deste estudo, o termo “você” se aplica a este menor. O responsável legal, por este menor, será solicitado a ler e dar permissão, por escrito, para que o menor participe deste estudo. Os referidos exames e procedimentos estão indicados abaixo.

NÚMERO DE PARTICIPANTES NESTE ESTUDO

Aproximadamente 1500 pessoas participarão deste estudo. Esta população é residente no Rio Grande do Norte foi avaliada previamente no estudo realizado pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte iniciado em 2002.

TEMPO DE DURAÇÃO DESTE ESTUDO

Se você concordar em participar deste estudo, será considerado como participante durante 3 anos, o tempo de duração desta parte do projeto.

PESQUISA GENÉTICA

Esta é uma pesquisa que se propõe a estudar informações no DNA relacionadas a essas doenças. DNA é a substância encontrada dentro das nossas células, herdada dos nossos pais e transmitidas por nós aos nossos filhos. O DNA será usado em estudos sobre calazar e doenças nas quais o sistema de defesa está envolvido, porque os fatores encontrados no DNA, ligados a nossa defesa e estudados neste projeto, podem também estar relacionados com outras doenças, como tuberculose e doenças inflamatórias.

PROCEDIMENTOS

Procedimentos a serem realizados para aqueles que concordarem em participar do estudo:

1. Responder um questionário referente a sua saúde, inclusive história de vacinação;
2. Coletar sangue (isolamento de células, DNA, plasma e soro, teste para o vírus HIV)
3. Teste de pele: teste de Montenegro (calazar) e teste tuberculínico (tuberculose)
4. Coleta de esfregaço da boca; (para extração de DNA, quando não for possível coletar sangue)
5. Avaliação da nutrição, através da medição das dobras da pele, visando estimar a quantidade de gordura do corpo e também do peso e altura.
6. Avaliação dos animais existentes no domicílio
7. Coleta da localização da residência, através de um aparelho denominado GPS.

RISCOS

Os riscos associados à participação neste estudo são mínimos e podem ser sangramentos ou manchas arroxeadas ou infecção no local da coleta do sangue e desmaio. No local da realização dos testes na pele, pode ficar um pouco doloroso ou endurecido. Os riscos desses procedimentos são minimizados, seguindo os cuidados de higiene e pressão. No caso de dor e endurecimento no local da realização dos testes na pele, prescreveremos um creme para uso local. Estes sintomas devem desaparecer no período de 72 horas.

Como esta pesquisa envolve o estudo de DNA, assumimos o compromisso que o mesmo será usado para os objetivos aqui propostos. No entanto, pedimos permissão para guardar o DNA, o soro e o plasma não utilizados, no Departamento de Bioquímica, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em tubos identificados através de um código. Seu nome não aparecerá no tubo. Qualquer outro projeto que venhamos a fazer com qualquer amostra coletada de você, que seja diferente do protocolo aqui escrito, será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, além de ser solicitado um novo termo de consentimento, antes que o estudo seja iniciado. Os resultados dos estudos genéticos serão mantidos em sigilo absoluto. Não permitiremos acesso as informações encontradas a terceiros; tais como, seguradoras de saúde e empregadores.

BENEFÍCIOS

Os benefícios em participar deste estudo são aqueles individuais, nos quais você será avaliado por um médico, que o acompanhará através de duas visitas anuais para determinar se você tem defesa contra o germe que causa o calazar. Os benefícios para a comunidade são aqueles decorrentes de estarmos mapeando áreas onde existem a doença calazar e podermos disponibilizar os resultados para a Fundação Nacional de Saúde. Esperamos também que esses estudos possam resultar em melhora na forma de prevenir o calazar, como o desenvolvimento de vacinas, e aprender porque somente algumas pessoas desenvolvem esta doença. Trataremos problemas médicos encontrados. Não haverá ônus para você em decorrência dos testes ou tratamento que realizarmos. Para problemas médicos mais complexos, você será encaminhado a um posto de saúde ou hospital público.

AGÊNCIA FINANCIADORA DESTE PROJETO DE PESQUISA

O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (NIH) financia, em parte, esta pesquisa. Isto significa que a Universidade da Virgínia, Universidade de Iowa e a Universidade Federal do Rio Grande do Norte recebem recursos financeiros do NIH em apoio as atividades científicas deste estudo.

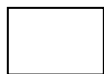
INFORMAÇÕES REFERENTES AO ESTADO DE SAÚDE A SEREM UTILIZADAS NESTE ESTUDO

Informações sigilosas sobre a sua saúde são aquelas que identificam você e estejam relacionadas com a sua saúde física e mental, seja passada, presente ou futura. Estas informações estão geralmente presentes no seu prontuário ou em anotações realizadas por profissionais de saúde. Ao assinar este termo de consentimento, você estará autorizando a liberação dos dados existentes no seu prontuário, para que nós possamos estudá-los. Os dados serão mantidas em sigilo e não os liberaremos para terceiros.

CONFIDENCIALIDADE DO ESTUDO

O registro da sua participação neste estudo será mantido em sigilo, até o limite permitido pela lei. No entanto, agências federais que regulamentam no Brasil ou nos Estados Unidos, os comitês de ética das Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Universidade Federal da Bahia, Universidade da Virgínia e Universidade de Iowa podem inspecionar e copiar registros pertinentes a pesquisa e estes podem conter informações identificadoras. Por sua vez, essas agências regulamentadoras dos comitês de ética, tanto no Brasil como nos Estados Unidos, manterão sigilo sobre dados, não disponibilizando-os a terceiros. Guardaremos os registros de cada pessoa, em sala trancada, e somente a Dra. Selma Jeronimo e/ou pesquisadores trabalhando na equipe terão acesso a estas informações. Cada indivíduo receberá um número para ser utilizado no laboratório.

| | | | | | |
|---|--|-----|--|-----|--|
| 4 | Autorizo coleta da informação referente a localização da minha residência | Sim | | Não | |
| 5 | Autorizo exames dos animais da minha residência, autorizo também coleta de sangue dos cães | Sim | | Não | |



Impressão digital para aqueles impossibilitados de escreverem seu nome ou não alfabetizados.

| Nome (letra de forma) | Assinatura | Data |
|-----------------------|------------|------|
| | | |

Pais ou responsáveis

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

Testemunha

COMPROMISSO DO INVESTIGADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes deste estudo ou com o seu representante legalmente autorizado. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e obrigações relacionadas a este projeto.

| Pesquisador Responsável | Assinatura | Data |
|-------------------------|------------|------|
| | | |

7.3. Publicações relacionadas a tese

1. Lacerda HG, Monteiro GR, Pontes NN, Rodrigues-Neto JF, Queiroz PV, Queiroz JW, Maciel BL, Pearson RD, Wilson ME, Jeronimo SM. The natural history of asymptomatic infection with the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. Submetido PLOS-Neglected Diseases.
2. Iraci D. Lima, Jose W. Queiroz, Henio G. Lacerda, Paula V. S. Queiroz, Nubia N. Pontes, James D. A. Barbosa, Daniella R. Martins, Jason L. Weirather, Richard D. Pearson, Mary E. Wilson, and Selma M. B. Jeronimo. *Leishmania infantum chagasi* in Northeastern Brazil: Asymptomatic Infection at the Urban Perimeter. Submetido The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.
3. The LeishGEN Consortium and the Wellcome Trust Case Control Consortium 2*. Genome-wide Association Study Highlights the Importance of the DRB1-DQA1 HLA Class II Region in Visceral Leishmaniasis. Submetido New England Journal of Medicine.
4. Maciel BL, Lacerda HG, Queiroz JW, Galvão J, Pontes NN, Dimenstein R, McGowan SE, Pedrosa LF, Jerônimo SM. Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Oct;79(4):591-8. PubMed PMID: 18840750.
5. Jeronimo SM, Duggal P, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Cabral AP, Pontes NN, Lacerda HG, Queiroz PV, Gomes CE, Pearson RD, Blackwell JM, Beaty TH, Wilson ME. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. *J Infect Dis.* 2007 Oct 15;196(8):1261-9. Epub 2007 Sep 13. PubMed PMID: 17955446; PubMed Central PMCID: PMC2330094.
6. Jeronimo SM, Holst AK, Jamieson SE, Francis R, Martins DR, Bezerra FL, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Lacerda HG, Miller EN, Cordell HJ, Duggal P, Beaty TH, Blackwell JM, Wilson ME. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. *Genes Immun.* 2007 Oct;8(7):539-51. Epub 2007 Aug 23. PubMed PMID: 17713557; PubMed Central PMCID: PMC2435172.

7.4. Artigo

PLoS Neglected Tropical Diseases

The natural history of asymptomatic infection with the protozoan *Leishmania infantum* chagasi

--Manuscript Draft--

| | |
|--|--|
| Manuscript Number: | |
| Full Title: | The natural history of asymptomatic infection with the protozoan <i>Leishmania infantum</i> chagasi |
| Short Title: | Asymptomatic Infection with <i>Leishmania</i> |
| Article Type: | Research Article |
| Keywords: | <i>Leishmania</i> ; asymptomatic infection; protective immunity; delayed type hypersensitivity; visceral leishmaniasis; leishmaniasis |
| Corresponding Author: | Selma M.B. Jeronimo Universidade Federal do Rio Grande do Norte Natal, Rio Grande do Norte BRAZIL |
| Corresponding Author Secondary Information: | |
| Corresponding Author's Institution: | Universidade Federal do Rio Grande do Norte |
| Corresponding Author's Secondary Institution: | |
| First Author: | Henio Godelro Lacerda |
| First Author Secondary Information: | |
| All Authors: | Henio Godelro Lacerda Gloria Regina Montelro Nubia Natalir Pontes Joao Firmino Rodrigues-Neto Paula Vivianne Quelroz Jose Wilton Quelroz Bruna Lima Maciel Richard Dale Pearson Mary Edyth Wilson Selma M.B. Jeronimo |
| All Authors Secondary Information: | |
| Abstract: | Manifestations of <i>Leishmania infantum</i> chagasi infection range from asymptomatic to fatal visceral leishmaniasis (VL). Cure or protection requires antigen-specific Type 1 immunity. The intradermal <i>Leishmania</i> skin test (LST) has been interpreted as a marker of protective immunity. However, it has not been shown that LST correlates with a Type 1 response, or whether LST and Type 1 immunity are maintained long-term. These questions were examined in an 8-year longitudinal nested case study of LST status and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) antigen-specific cytokine responses within a Brazilian family cohort. Of the 331 subjects, 46.2% (n=153) were LST positive at the study onset. The positive LST prevalence and size increased with age (p=0.0021). 15.7% (n=24) of LST positive subjects "retro-converted" to negative, and 50.4% (64 of 127) of LST negative subjects became LST positive. The LST size correlated significantly with PBMC antigen-induced IFN- γ secretion (r=0.6186, p<0.0001). IL-6 was released at higher levels by PBMCs of subjects who retro-converted from positive to negative LST than subjects with stable LST status (p=0.005). These data suggest that differences in innate immune responses may affect whether individuals maintain a positive LST response. PBMC IFN- γ might suffice as a |

Powered by Editorial Manager® and Preprint Manager® from Aries Systems Corporation

| | |
|-----------------------------|---|
| Suggested Reviewers: | surrogate marker for protective immunity instead of LST response. Shaden Kamhawi National Institutes of Health SKAMHAW@niaid.nih.gov She works of leishmaniasis Diane MacMahon-Pratt Yale University diane.mcmahon-pratt@yale.edu Expert in immunology of leishmaniasis Peter Melby The University of Texas Health Science Center pemelby@utmb.edu Expert in leishmaniasis Aida Cruz, MD Floacruz-RJ aida@loc.floacruz.br Expert in human leishmaniasis |
| Opposed Reviewers: | |



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

October 23, 2011

Dear Editor,

I am writing to thank you for agreeing in reviewing our manuscript entitled, "The natural history of asymptomatic infection with the protozoan *Leishmania infantum chagasi*."

As we mentioned in our pre-submission letter, our group started a study around the perimetropolitan area of Natal in 1996 with the aim to understand the genetic risk to developing symptomatic and asymptomatic leishmania infection. Cure or protection against developing visceral leishmaniasis requires antigen-specific Type 1 immunity and the intradermal Leishmanin skin test (LST) has been interpreted as a marker of protective immunity. However, it is not known how long one retains this marker and their immune correlates.

By following a large group of people with different levels of exposure to sand flies, we have learned that a subgroup of people lose their LST response to *Leishmania* antigens over time, whereas others retain. We found a good correlation with INF γ for the ones that retain the LST response, whereas the ones that lose the response their peripheral blood mononuclear cells still respond to *Leishmania* stimulation with IL-6 release. We believe that differences in innate immune responses may affect whether individuals maintain or cure asymptomatic *L. i. chagasi* infection. This manuscript summarizes these findings.

Sincerely,

Selma M.B. Jeronimo, MD, PhD
Corresponding author

The natural history of asymptomatic infection with the protozoan *Leishmania infantum chagasi*

Running title: Asymptomatic infection with *Leishmania*

Hênio G. Lacerda,^{1,2} Gloria R Monteiro,¹ Núbia N. Pontes,¹ Joao F. Rodrigues-Neto,³ Paula V. Queiroz,¹ Jose W. Queiroz,¹ Bruna L. Maciel,^{3,4} Richard D. Pearson,⁵ Mary E. Wilson,⁶ and Selma M. B. Jeronimo^{1,3,7}

¹Health Post Graduate Program, ²Department of Infectious Diseases; Health Science Center; ³Department of Biochemistry, Bioscience Center, ⁴Department of Nutrition, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil; ⁵Departments of Medicine and Pathology, Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, Charlottesville, VA; ⁶Departments of Internal Medicine, Microbiology and Epidemiology, University of Iowa and the VA Medical Center, Iowa City, IA, USA; ⁷Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT-DT/CNPq), Brazil

Corresponding Author

Selma M.B. Jeronimo

Department of Biochemistry, Biosciences Center

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Natal, RN, Brazil, 59072-970

Email: smbj@cb.ufrn.br

Abstract

Manifestations of *Leishmania infantum chagasi* infection range from asymptomatic to fatal visceral leishmaniasis (VL). Cure or protection requires antigen-specific Type 1 immunity. The intradermal Leishmanin skin test (LST) has been interpreted as a marker of protective immunity. However, it has not been shown that LST correlates with a Type 1 response, or whether LST and Type 1 immunity are maintained long-term. These questions were examined in an 8-year longitudinal nested case study of LST status and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) antigen-specific cytokine responses within a Brazilian family cohort. Of the 331 subjects, 46.2% (n=153) were LST positive at the study onset. The positive LST prevalence and size increased with age ($p=0.0021$). 15.7% (n=24) of LST positive subjects “retro-converted” to negative, and 50.4% (64 of 127) of LST negative subjects became LST positive. The LST size correlated significantly with PBMC antigen-induced IFN- γ secretion ($r=0.6186$, $p<0.0001$). IL-6 was released at higher levels by PBMCs of subjects who retro-converted from positive to negative LST than subjects with stable LST status ($p=0.005$). These data suggest that differences in innate immune responses may affect whether individuals maintain a positive LST responses. PBMC IFN- γ might suffice as a surrogate marker for protective immunity instead of LST response.

Key words: Leishmania, asymptomatic infection, protective immunity, delayed type hypersensitivity, visceral leishmaniasis, leishmaniasis

Author Summary

Leishmaniasis constitutes a complex of clinical syndromes caused by *Leishmania* species protozoa. Manifestations of *Leishmania infantum chagasi* (*L.i.chagasi*) infection range from asymptomatic to fatal visceral leishmaniasis (VL). Cure of disease and immunity to reinfection require antigen-specific T cells producing interferon-gamma ($\text{IFN}\gamma$). *L.i.chagasi* infections are diagnosed by culture, microscopic identification of parasites, serology and/or intradermal Leishmanin skin test (LST). A positive LST develops after recovery from VL or asymptomatic *L.i.chagasi* infection, suggesting LST may be a marker for protective immunity against symptomatic disease. It is not known how long the LST remains positive, or how LST corresponds to the other marker of protective immunity, T cell $\text{IFN}\gamma$. A study of 331 subjects from an endemic region of northeast Brazil showed good correlation between LST and $\text{IFN}\gamma$. Most people who were LST positive remained positive over 8 years, although a subset (15%) “retroconverted” from LST positive to negative. Rather than suggesting they had lost immunity, retroconverted T cells produced more IL-6 from immune T cells than non-converting subjects. We hypothesize these differences may indicate that some individuals with a uniquely vigorous innate immune response can cure asymptomatic *L.i.chagasi* infection.

Introduction

Visceral Leishmaniasis (VL) or kala-azar is a potentially fatal disease caused by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil and other Latin American countries.(1) Corresponding to urbanization during recent years, endemic areas for VL in Brazil have spread from rural to perimetropolitan areas of large cities as Natal,(2) Belo Horizonte,(3) Fortaleza,(4) among others (5;6). This has resulted in a large number of people at risk for *L. i. chagasi* infection throughout Brazil and other Latin American countries.(7;8)

The clinical manifestations of *L. i. chagasi* infection range from asymptomatic infection to severe symptomatic VL,(9) which is characterized by progressive fever, cachexia, and hepatosplenomegaly, with pancytopenia, low serum albumin, high titers of anti-*Leishmania* antibodies and polyclonal B-cell activation.(1;9;10) Asymptomatic infection is documented by a positive delayed hypersensitivity test to *Leishmania* antigens, called the Leishmanin skin test (LST), in the absence of symptoms. By this measure, the ratio of symptomatic to asymptomatic infection was reported to be 1 to 6 children from rural endemic areas of Brazil,(11;12) but recent studies suggest it to be lower in periurban areas. Indeed, we previously reported that 40% of family members of subjects with current or prior VL had evidence of asymptomatic infection.(7) Our prime measure of asymptomatic infection is based upon response to LST antigens, but preparations are variable and the test is not approved by US regulatory agencies. Thus it would be useful to determine whether LST corresponds with lymphocyte proliferation and/or type 1 cytokines as markers of adequate Type 1 immunity.

Leishmania spp. are intracellular parasites residing primarily in macrophages of the mammalian host. Peripheral blood cells from individuals with symptomatic VL

lack parasite antigen-specific peripheral blood mononuclear cell (PBMC) responses, and remain LST negative during disease.(13;14) Resolution of symptoms coincides with development of a positive LST and of antigen-specific PBMC type 1 cytokine responses. Similar type 1 T-cell derived cytokines are produced by PBMCs of individuals with prior asymptomatic infection.(15) Thus, PBMCs from subjects who have either recovered from VL or who have asymptomatic *L. i. chagasi* infection demonstrate a vigorous proliferative response to leishmania antigens.(16-18) It is presumed that asymptomatic Leishmania infection results in a state of resistance to the development of VL. It is also presumed that this resistant state, marked by a positive LST response, is retained lifelong in individuals who do not become immunocompromised.(19;20) However evidence underlying these presumptions is lacking, inspiring us to embark on a careful examination of the asymptomatic “presumed immune” state.(19,23)

The propensity of an individual to develop a positive LST is determined in part by their genetic background.(21;22) Longitudinal study indicate that some infected (seropositive) subjects may either not develop or not retain a long-lasting positive LST response.(19) Whether the infected LST negative persons have developed and resolved the LST according to the time of clearance of the parasite, or whether they failed to develop an LST in the first place was not determined. The observations do suggest that not all exposed individuals will develop a long-standing positive skin test.(19) As such, it seemed warranted to examine the duration and stability of the asymptomatic infection status, defined by an immune response detected as a positive LST test, in a constantly exposed population.

The current study focused on subjects living in periurban areas surrounding Natal in northeast Brazil, where *L. i. chagasi* infection is endemic and ongoing. The

majority of LST positive subjects remained positive throughout the 8 years of study, but a notable subset of asymptotically infected persons lost both their LST response and their antigen-specific IFN- γ responses to parasite antigens.

METHODS

Ethical considerations

Studies with human subjects were performed according to guidelines of the Brazilian Minister of Health, the United States Department of Health and Human Services and those of the participating universities. The project was reviewed and approved by Institutional Review Boards of the Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Ethical Committee CEP-UFRN 19-01 and 172-06), the University of Iowa and University of Virginia. Studies were also approved by the National Brazilian Ethical Commission of Research [CONEP 4572 and 13745; certificate of approval number 0139-0.0.051.069-06 (<http://portal2.saude.gov.br/sisnep/>)]. The UFRN Ethical Committee is registered with the National Institutes of Health. Informed consent was obtained from all study subjects or their parents or legal guardians.

Studied Population

A cohort of families residing in endemic area for VL has been followed up since 1996. A total of 2020 people have been entered into this family study (21). A nested case study of 331 individuals was performed to assess the status of LST response over time. Subjects for the nested study were chosen because they continued to reside in the area and because of their initial phenotype status. Pregnant women and subjects with any immunosuppressive condition were not included in this study, since their condition could alter the immune response to Leishmania antigens. Subjects were characterized as symptomatic VL (underwent treatment between the initial enrollment and follow up), history of VL (past successful treatment at first enrollment); positive LST test with no signs or symptoms of VL (presumed asymptomatic infection); negative LST and positive anti-leishmania

antibodies, or negative LST and negative anti-leishmania antibody responses. Table 1 shows the characteristics of the study subjects.

Data collection

Demographic information included age, sex, and time of residence in the endemic neighborhood, behavioral risks for exposure to sand flies, and contact with VL subjects or to dogs. A medical history included acute or chronic underlying illness, any type of infection two weeks prior to LST assessment, vaccination history, and medication intake. Subjects underwent a physical examination and assessment of body mass index (BMI).

Leishmania infection

Anti-leishmania antibody status was determined by ELISA using a soluble lysate of *Leishmania* promastigotes (SLA) obtained from a local *L. i. chagasi* isolate (IOC-3071) as previously described.⁽²⁴⁾ The cut off value for the assay of 0.213 was set as 3 SD above the mean result for 1:200 diluted sera from unexposed subjects. The delayed type hypersensitivity response was assessed using the commercially available *Leishmania* skin test kindly provided by Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológico/PR (CPPI, Paraná, Brazil). This skin test antigen is prepared from an isolate of *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/PH8), and is the only source of LST skin test antigen used for clinical assessment of leishmaniasis exposure in Brazil. The LST induration was read after 48-72 hours after placement with a ball point pen as described.⁽²⁵⁾ Thus our test correlated with current standards for assessment of LST throughout the country of Brazil. An area of induration of 5 mm or greater 48-72 hrs after intradermal test inoculation was considered positive. LST was not tested in pregnant women or children under age 3, and the interval between the two tests was greater than one year to avoid false positive responses.⁽²⁵⁾ All subjects underwent

LST and serologic testing when initially entered into the study. The 331 individuals chosen for the nested study were re-tested an average of 8.1 years (SD \pm 2.2) years after the first assessment.

Cytokine and chemokine responses

PBMCs were separated from whole blood elements by density sedimentation using ficoll hypaque (GE Healthcare). Five $\times 10^5$ PBMCs per well of 96 well microplates were incubated without or with 1 μ g/ml of SLA, in triplicate conditions, at 37 $^\circ$ C, 5% CO₂ for 72 hours. Supernatants were collected and frozen for subsequent cytokine and chemokine measurement. Cytokines (IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ) and chemokines (CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10) were quantified in a multiplex fluorescence assay (Luminex[®] Extracellular Assay).

Subjects were considered in groups depending on whether their original LST status changed from positive to negative or vice versa, or remained constant. Cytokines and chemokines were analyzed as quantitative variables. Data were stored and analyzed using SPSS [®] (Statistical Package for the Social Sciences) version 11.5 for Windows. The confidence interval was 95% (1-alpha) and 80% power (1-beta). Statistical comparisons between groups were made using GraphPad Prism version 4.01 for Windows (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Chi-square and Fisher exact tests were used to assess the association between categorical variables. The results were presented as mean and median when the data had normal and asymmetric distribution respectively. ANOVA parametric test was used to determine differences between the means of groups for normal quantitative data, whereas Mann-Whitney or Kruskal-Wallis non parametric tests were used to validate the result of small size group or when the data did not have a normal distribution. The Spearman correlation coefficient was used to verify the extent of association

between continuous variables. A logistic regression with multinomial response was used to analyze the variation in LST at the two time points, with adjustment for epidemiological factors potentially influencing the response, including presence of VL case in the household.

Results

1. Longitudinal study of *Leishmania infantum chagasi* infection in endemic area of Rio Grande do Norte.

A total of 331 subjects were entered into the study. Their characteristics are shown in Table 1. Of the studied subjects, 191 (57.7%) were females and 140 (42.3%) were males. The age ranged from 4 to 89 years (median 20 years, interquartile range 12-41) and 73% of subjects were younger than 40 years. The mean time interval between the first and second test of LST response was 8.1 ± 2.2 years (mean \pm SD). At the time of initial evaluation, 153 (46.2%) of the 331 subjects had a positive LST response with no previous history of VL treatment. Of the positive LST subjects, 84.3% (n=129) remained LST positive and 24 (15.7%) became LST negative at the time of follow-up. 64 (50.4%) of 127 subjects with an initial negative LST response became LST positive, and 51 (40.1%) remained LST negative (Table 1).

Of the 51 VL subjects, 10 (19.6%) were diagnosed within the first study and their initial LST was negative, with a mean induration of 0.4 mm. Four had symptoms of VL at first examination, with positive anti-leishmania antibodies, and were admitted to the hospital and treated for VL. Six subjects who were asymptomatic and had negative anti-leishmania antibodies developed disease within a year after first examination. All of the 41 recovered VL subjects (80.4%) had a positive LST response, with median of 12 mm induration (IQR= 10-15) and they remained positive after 8 years (IQR= 7-9.3) post-treatment. A previous history of treated VL was strongly associated with a positive LST reaction on second visit ($p=0.00001$). There was a concomitant increase in the LST induration size over time

(Spearman $r = 0.3$, $p = 0.03$), with coincident decrease of the levels of antibodies (Spearman $r = -0.5$, $p = 0.0003$, Figure 1).

2. Factors associated with Leishmania infection and the LST response in asymptomatic individuals

A significant positive association between age and LST response was observed ($p = 0.001$), Table 2, with a median of 30 (IQR = 16-50) years for LST+ and 14 for the LST- (IQR = 10-31), Figure 2A. The size of the LST response increased with age, ($r=0.27$, $p=0.002$; Figure 2B). Sex was not associated with having a positive versus negative LST reaction ($p = 0.54$). However, residing in the household with a VL case increased the risk of a positive LST response by about two-fold (OR = 1.96, $p=0.04$, 95% CI=1.03 to 3.76).

To address whether other diseases potentially confound the interpretation of LST responses, we investigated a possible association between underlying diseases and the size of LST reaction. Symptoms of infection within 15 days prior to placement of LST ($p=0.57$), or a history of hypertension ($p=0.1$), or diabetes ($p=0.66$) were not associated with variation in the LST response. Eosinophilia is one indicator of intestinal helminthes, a prevalent condition in this population. However, having a peripheral blood eosinophil count above the basal cutoff was not associated with having a positive LST response ($p = 0.65$). Additionally, having received any type of immunization within six months prior to the second LST was not associated with a positive or negative response ($p = 0.2$). Finally, measures of nutritional status, i.e. BMI ($p = 0.31$), were not associated with the LST response status.

Factors which could create a favorable environment for sand fly habitat were not associated with the LST response status. These factors included the type of housing ($p=0.96$), proximity of the household to vegetation ($p = 0.23$) and living with

animals housed outdoors ($p = 0.51$). Neither the presence of one or more dogs housed in the home ($p = 0.96$) or having positive anti-leishmania serology ($p = 0.47$). Table 2 lists demographic, health and environment factors assessed according to LST status in the population.

3. Immune responses according to LST status

Cytokines and chemokines released by PBMCs incubated with parasite antigens (SLA) were tested at the follow up examination date. Considering all persons without a history of symptomatic VL, the amount of IFN- γ , TNF- α and IL12 released by PBMCs from individuals with a positive LST response were significantly higher than subjects with a negative LST (Table 3). No significant differences in IL-4, IL-10, IL-6 or IL 7 were observed. Importantly, the level IFN- γ was directly correlated with the size of LST induration, ($r=0.6186$, $p=0.0001$), Figure 3. Neither of the chemokines CXCL9/MIG or CXCL10/IP-10 was significantly different between LST+ versus LST- persons. Considering changes in LST status over ~8 years after the initial examination, changes in cytokines and chemokines was informative. The antigen-induced IFN- γ level was significantly higher in individuals recovered from VL than those who remained consistently LST-/- (Table 3 and Figure 4.A). Even in individuals who had “cured” their positive LST, IFN- γ and TNF- α values were significantly elevated over control subjects, showing that antigen-specific type 1 immune responses were still detectable in some individuals. IL-12 levels, in contrast, were significantly higher in the VL and the LST+/+ groups than either LST+/- or LST-/- individuals, and the mean value was even lower in those who had cured the LST response than those who never developed a positive test. Levels of released IL-4, IL-10, IL-7, CXCL9/MIG and CXCL10/IP-10 were not significantly different between the four groups analyzed (Table 3). Notably, IL-6 was highest in individuals who

“cured” their LST from positive to negative. IL-6 was high in many individuals who recovered from VL, and a smaller number of individuals who remained LST positive throughout the study period (means in Table 3, Figure 4.B). IL-6 levels produced by PBMCs of subjects who remained LST negative were lower than subjects in all groups who were LST+ at the time of 2nd examination ($p=0.005$, Figure 4.B) . This high level of IL-6 in subjects who converted from positive to negative LST raises hypotheses regarding the role of innate immune immunity in persons with asymptomatic Leishmania infections.

Discussion

Infection with *Leishmania infantum chagasi* can lead to a spectrum of clinical presentations, ranging from asymptomatic or subclinical infection with a strong parasite antigen-specific TH-1 type cellular immune response (26-29), to symptomatic VL with deficient Type 1 cellular immune responses to leishmania antigens.(7;30;31) Traditionally, the LST response has been considered a marker of cured infection and immune resistance to developing or re-developing VL,(19;32). In contrast, during cutaneous and mucosal leishmaniasis caused by *L. braziliensis*, the LST is a marker of active disease with progressive pathology.(33) Consistent with this contention, subjects participating in the current study who were cured from a documented episode of VL became LST positive, as described in other studies.(11;12;30;34) There was no relapse of VL among the recovered VL subjects, and LST responses remained positive for at least 14 years after the diagnosis of VL. In addition, 10 subjects in our cohort were initially LST negative but developed VL during the study. All ten VL subjects converted to LST positive after clinical cure.

There were no apparent environmental factors or individual co-morbidities amongst individuals living in the endemic region negative LST response. It is possible these persons were never bitten by a sand fly carrying *Leishmania* parasites. Alternatively, they may have been exposed but cleared parasites quickly through innate immune mechanisms and never developed the type 1 T cell response marked by a positive LST. A third possibility is that they have developed and lost the skin test evidence of an adaptative type 1 response to parasite antigens over time.

We report herein an increase in the prevalence of positive LST responses, and an increase in LST size with increasing age, confirming previous reports (35-39). Adults could have a more robust Type 1 cellular immune response than children,

which could in part explain their disproportionate burden of VL in endemic regions.(12;40-42) Recent infections or vaccinations, and nutritional status as measured by BMI, were not factors influencing the LST response. A previous study of asymptomatic children in the same region showed that the duration of breastfeeding was associated with an increased likelihood of positive LST response (43). Although we did not re-examine this parameter, this could reflect overall health status due to the protective effect of breast milk.

More surprising was the fact that the presence of domestic dogs was not associated with a positive LST reaction. This finding reinforces previous studies conducted in the region,(7) showing that ownership of infected dogs or other animals, was not associated with human infection when analyzed at the level of individual households. In contrast, when analyzing groups of households as a unit, the presence of dogs and other animals in the neighborhood were significantly associated with increased risk of infection with *L.i.chagasi*, detected either by a positive LST response or VL. In the current cohort, individuals living in a household in which a member had developed VL were at risk for having a positive LST response. Whether this reflects a common environmental exposure, genetics, or the presence of a human reservoir for *L.i.chagasi* cannot be discerned from this study.(44)

The cytokines IFN- γ , IL12 and TNF α (45-48), and the chemokines CXCL9/MIG have been shown to be important for controlling Leishmania infection (47;49). We found associations between these molecules and a positive LST response, both in subjects successfully treated for VL and in subjects with asymptomatic *L. i. chagasi* infection. These observations support the hypothesis that LST is a marker of protective cellular immunity against symptomatic VL. They also

raise the possibility that type 1 cytokines produced in response to Leishmania antigen could serve as a marker of protective immunity in settings where LST testing is either not available (e.g., the U.S.A.) or not advisable (e.g. pregnancy). There was not 100% correlation between antigen-induced IFN- γ and LST positive status (see Figure 4.A). Furthermore, not all individuals with PBMCs producing high levels of antigen-induced IFN γ were also high for other type 1 markers (TNF- α , IL-12, MIG). This suggests that a rapid “quantiferon”-type test of T cell IFN- γ production may not be an optimal LST substitute, whereas a test of cellular immunity that showed a panel of antigen-responsive type 1 cytokines/chemokines could constitute a better LST surrogate.

PBMCs from the subset of LST positive persons who became LST negative over time produced IL-6 in response to soluble leishmania antigens. Experimental studies have shown that bone marrow cells deficient for IL-6 did not protect against Leishmania *in vivo*,⁽⁵⁰⁾ and IL-6 deficient mice have an impaired lymphocytic response to vaccine challenge. Consistently, our findings suggest a potential role for IL-6 in protection against the development of symptomatic VL.

The LST response is different in subjects acquiring VL in India, which is caused by *L. donovani* in that region of the world. A conversion from positive to negative LST response over time has been observed, particularly when the source of antigen used to generate the LST test was a species other than *L. donovani*.^(23,29;51) The unreliability of the test has either resulted in, or resulted from a situation in which there is not a standard LST antigen used for diagnosis of cured VL in that country. The Brazilian LST test is a standard preparation made according to GMP standards from *L. amazonensis* antigens, and serves as a reliable marker for type 1 responses to all *Leishmania* spp. prevalent in the country. We

hypothesize that the maintenance of a positive LST response could indicate the persistence of subclinical Leishmania infection.(51) Although it is difficult to document persistent parasites, the current and other reports in the literature suggest that a positive LST and the maintenance of immune markers of prior infection occur in the same subjects.(23;52,53)

This hypothesis leads to an intriguing corollary regarding the 15% of initially LST positive subjects who became LST negative over time. None of these LST “retroconvertors” developed symptomatic VL. They were younger in age and had a smaller initial LST size compared to LST “maintainers”. This leads us to speculate that these individuals may have cleared persistent parasites from their tissues through effective innate and/or adaptive microbicidal responses. Indeed, the higher IL-6 level in these individuals raises the suggestion that innate immune mechanisms may be more efficient or effective than others in the study.

The current report constitutes the first long-term follow up of a positive or negative LST status in Brazilians. Although the general impression that protective immunity to leishmaniasis is life-long, we were able to show that most people do retain their markers of type 1 immunity for at least 8 years, although subset converted from positive to negative over this time. In order to understand the biological significance of the LST response and PBMC cytokine markers of immune status additional long-term studies are needed.

Legends to the figures

Figure 1. LST and anti-leishmania antibody responses in persons with symptomatic VL following treatment. Individuals were encountered after successful treatment for acute VL. Both the size of LST induration and the OD of the ELISA value were plotted against the number of years since successful treatment of VL. Anti-leishmania antibodies levels, reflected in the magnitude of OD reading, were inversely correlated with time since VL treatment ($p=0.0003$). Conversely, the size of LST induration increased proportionately with time since treatment of acute VL ($p=0.0337$).

Figure 2. The result of the LST responses considering positive or negative in accordance to cut off value of 5 mm. **A.** The LST response in asymptomatic subjects increased with age, and **B.** there was a linear correlation between the size of induration and age of subjects, (Spearman, $r= 0.27$; $p=0.0021$). In this analysis subjects with VL were not included.

Figure 3. The size of LST was associated with the amount of IFN γ ($r=0.6186$, CI 0.3863 to 0.7771, $p<0.0001$, $N=44$).

Figure 4. **A.** IFN γ response by LST phenotype. The highest levels of IFN γ were seen in persons previously treated for VL and in asymptomatic subjects who were LST+ **B.** Levels of IL-6 by LST phenotype. IL-6 was significantly higher in LST+ and LST +/- groups compared to the LST-/- group ($p= 0.005$).

Figure 1

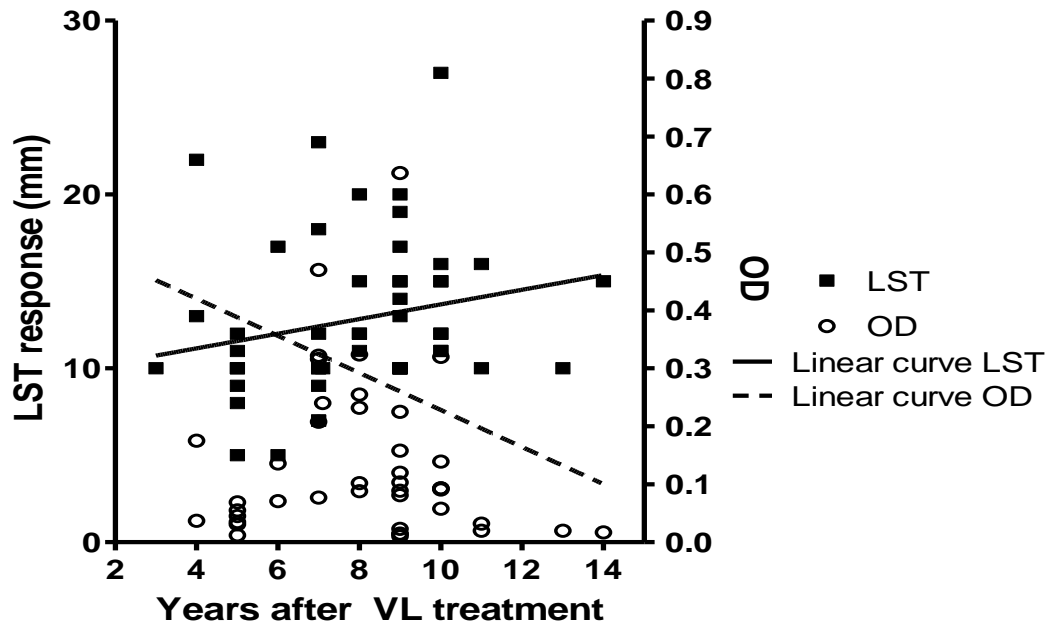


Figure 2 A

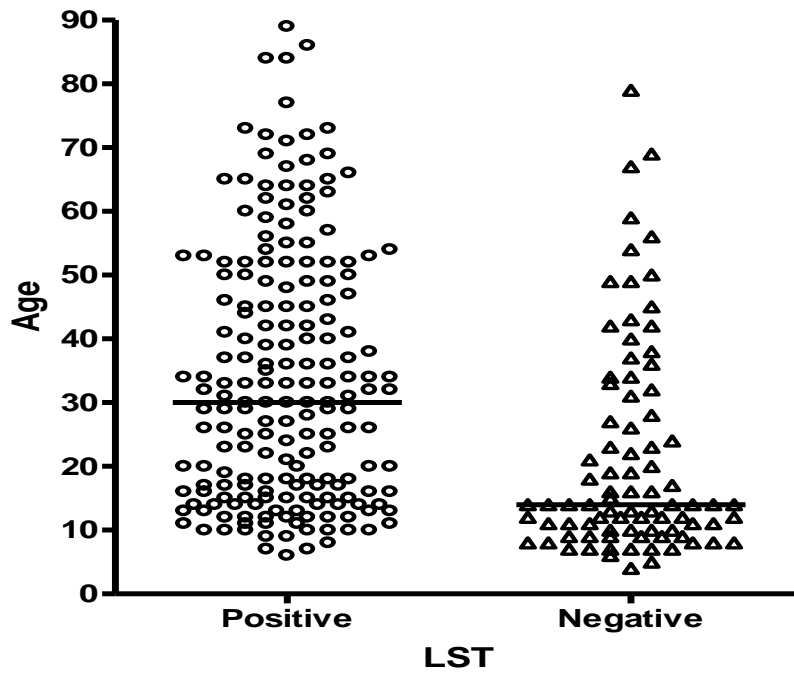


Figure 2B

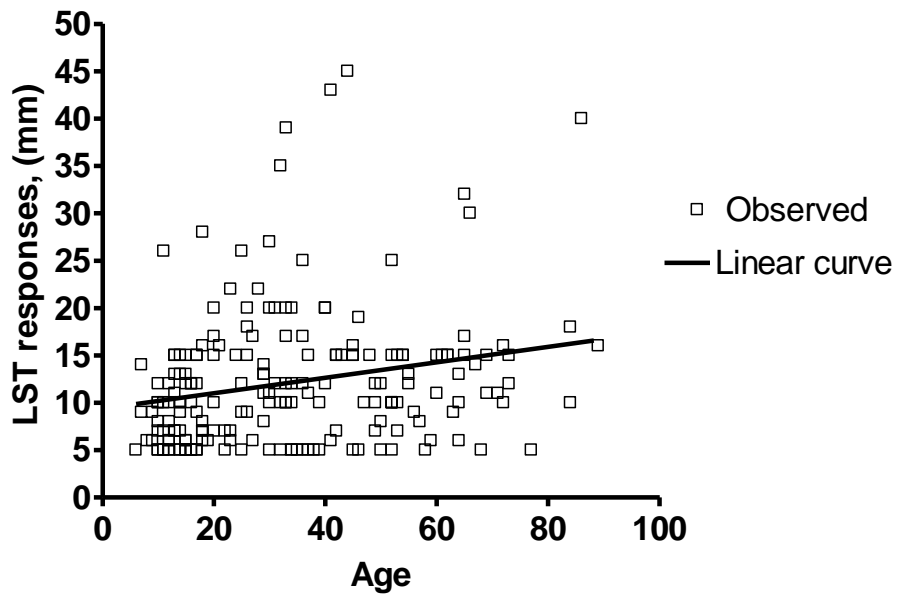


Figure 3.

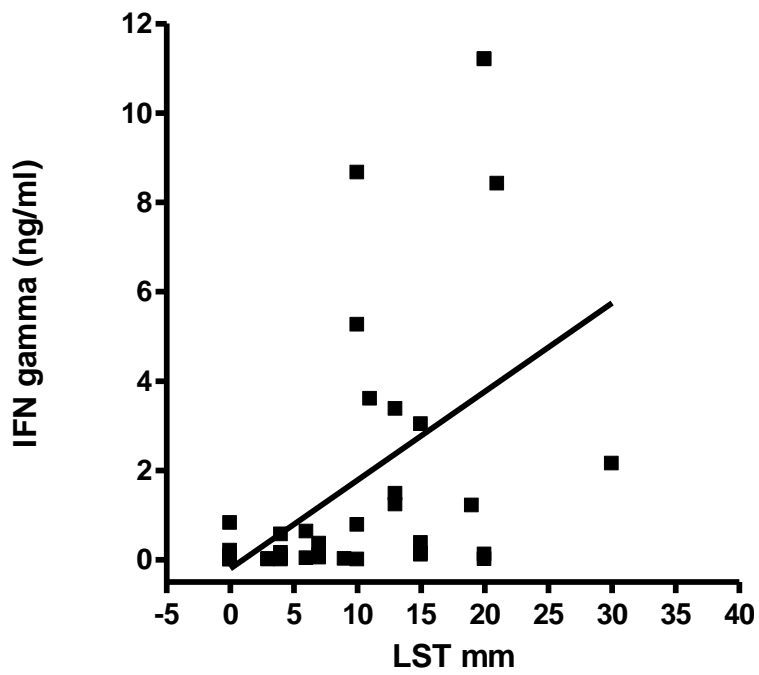


Table 1. Characteristics of subjects considering either symptomatic or asymptomatic VL. SLA, LST size and age are indicated both at the time of the first and the second measurements (SLA1, SLA2, LST1, LST2, Age1, Age2). The cutoff for a positive LST was 5 mm, whereas serologic response was assessed by the relative value's natural logarithmic, since the cut off value of the assay was different in the two time point.

| | | Characteristics (n) mean and SE | | | | | | |
|---|-------------|---------------------------------|------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|--------------|
| Phenotypes | | SLA1 ⁽¹⁾⁽²⁾ | SLA2 ⁽¹⁾⁽²⁾ | LST1 ⁽¹⁾ | LST 2 ⁽¹⁾ | Age 1 ⁽¹⁾ | Age2 ⁽¹⁾ | %Male (n, %) |
| VL | Symptomatic | (10) 0.15 ±0.57 | (10) 0.43 ±0.48 | (10) 2.40 ±2.00 | (10) 12.90 ±1.90 | (10) 12.30 ±7.03 | (10) 19.40 ±7.09 | (10) 50.00% |
| | Recovered | (39) 0.47 ±0.26 | (39) 0.61 ±0.18 | (41) 8.85 ±1.23 | (41) 12.76 ±0.65 | (41) 9.12 ±1.55 | (41) 15.39 ±1.56 | (41) 63.41% |
| Asymptomatic | DTH +/+ | (128) 1.51 ±0.13 | (123) -0.85 ±0.09 | (129)16.085 ±0.68 | (129)13.40 ±0.64 | (129)31.06 ±1.68 | (129) 37.97 ±1.68 | (129) 36.43% |
| | DTH +/- | (24) 2.06 ±0.29 | (24) -1.06 ±0.16 | (24) 8.63 ±1.04 | (24) 1.96 ±0.41 | (24) 18.75 ±3.32 | (24) 25.42 ±3.34 | (24) 41.67% |
| | DTH -/- | (51) -1.72 ±0.19 | (51) -1.24 ±0.12 | (51) 0.29 ±0.14 | (51) 1.20 ±0.25 | (50) 12.26 ±1.97 | (50) 18.34 ±2.06 | (51) 37.25% |
| | DTH -/+ | (64) -1.91 ±0.20 | (64) -1.12 ±0.10 | (64) 0.28 ±0.12 | (64) 9.64 ±0.82 | (64) 18.92 ±2.40 | (64) 25.89 ±2.44 | (64) 46.88% |
| (1) mean ± SE, where $SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$ and $CI(95\%) = mean \pm 1.96 SE$ (2) $\log\left(\frac{SLA}{Cut\ Off}\right)$. | | | | | | | | |

Table 2. Analysis of environmental factors according to LST responses status. Most data were analyzed by Chi-square. Age was analyzed by Kruskal-Wallis.

| Variable | LST status over time n (%) | | | | | <i>P Value</i> |
|------------------------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------|
| | Total subjects | Remained LST positive | Switched from negative to positive | Remained LST negative | Switched from positive to negative | |
| Number of subjects | 280 | 129 | 65 | 62 | 24 | |
| Age mean (\pm SD) | 280 | 38 (\pm 19) | 26.1 (\pm 19.4) | 19.7 (\pm 16.7) | 25.4 (16.3) | 0.001* |
| Male | 109 | 47 (36.4%) | 30 (46.2%) | 22 (35.5%) | 10 (41.7%) | 0.54 |
| Illness > 15 days | 63 | 29 (22.7%) | 11 (17.2%) | 17(27.4%) | 6 (25.0%) | 0.57 |
| Hypertension | 27 | 17 (13.2%) | 7 (10.8%) | 3 (4.9%) | 0 (0.0%) | 0.10 |
| Diabetes | 8 | 3 (2.3%) | 3 (4.6%) | 2 (3.3%) | 0 (0.0%) | 0.66 |
| History of vaccination | 47 | 28 (22.2%) | 7 (10.9%) | 9 (15.0%) | 3 (12.5%) | 0.20 |
| Mud walls | 43 | 20 (15.5%) | 11 (16.9%) | 9 (14.5%) | 3 (12.5%) | 0.96 |
| Vegetation | 262 | 122 (94.6%) | 61 (93.8%) | 55 (88.7%) | 24 (100.0%) | 0.23 |
| Any type of animal in the backyard | 224 | 107 (82.7%) | 48 (73.8%) | 50 (80.6%) | 19 (79.2%) | 0.51 |
| Presence of dogs in the household | 149 | 68 (52.7%) | 34 (52.3%) | 33 (53.2%) | 14 (58.3%) | 0.96 |
| Chicken in the back yard | 162 | 77 (59.7%) | 33 (50.8%) | 38 (61.3%) | 14 (58.3%) | 0.61 |
| Dog in neighborhood | 195 | 88 (68.2%) | 44 (67.7%) | 43 (69.4%) | 20 (83.3%) | 0.49 |
| Dog with VL by serology | 36 | 23 (62.2%) | 7 (53.8%) | 3 (33.3%) | 3 (50.0%) | 0.47 |
| Eosinophils > 5% | 218 | 104 (87.4%) | 54 (87.1%) | 44 (81.5%) | 16 (80.0%) | 0.65 |
| BMI >26 | 78 | 43 (40.2%) | 16 (29.6%) | 14 (27.5%) | 5 (27.8%) | 0.31 |

Table 3. Cytokine/chemokine levels in PBMC supernatants tested at the time of the 2nd LST measurement. Data are shown for individuals with a history of VL (all of whom were LST+ at follow-up). For those without a VL history, data are shown according to LST status. Values shown are the median and confidence interval 90%. Cytokine levels are expressed as protein (pg/ml) considering the status at the time of 2nd LST test.

| Cytokine | Symptomatic VL | | Exposed and asymptomatic <i>L.i. chagasi</i> (tested at the time of follow-up examination) | | | | P value | Exposed and asymptomatic <i>L.i. chagasi</i> (tested at the time of follow-up examination) | | | | | | P value |
|---------------|------------------------|----|--|----|-----------------------|----|---------|--|----|------------------------|----|-----------------------|----|---------|
| | | N | LST+ | N | LST- | N | | +/+ | N | +/- | N | -/- | N | |
| IFN- γ | 992.3 (1.1-5257.5) | 16 | 373.9 (0.7-11197.8) | 11 | 27.8 (0.7-781.2) | 22 | 0.03 | 377 (0.7-11197.9) | 11 | 76.3 (0.2-819.2) | 9 | 18.2 (3.5-86.73) | 13 | 0.04 |
| TNF- α | 419.1 (7.6-1550.3) | 16 | 230.7 (90.6-3355.4) | 11 | 158.9 (12.8-525.7) | 26 | 0.05 | 230.7 (90.6-3355.4) | 11 | 200.8 (13.7-573.5) | 10 | 138.7 (12.4-436.9) | 16 | 0.017 |
| IL-12 | 2.6 (1.0-11.7) | 10 | 3.0 (0.9-9.4) | 6 | 1.22 (0.8-3.4) | 14 | 0.02 | 3.0(0.9-9.5) | 6 | 0.9 (0.9-1.3) | 5 | 1.63 (0.8-3.4) | 9 | 0.02 |
| IL-10 | 50.8 (1.9-470.0) | 16 | 64.7 (2.0-1972.7) | 11 | 22.7 (1.8-139.8) | 25 | 0.42 | 64.7 (2.0-1972.7) | 11 | 58.7 (1.8-109.7) | 10 | 15.7 (2.1-147.2) | 15 | 0.63 |
| IL-4 | 22.1 (5.3-203.8) | 16 | 9.89 (4.0-260.1) | 11 | 10.6 (2.1-30.9) | 24 | 0.35 | 9.9 (4.0-260.2) | 11 | 11.1 (2.1-30.0) | 9 | 8.3 (2.-31.1) | 15 | 0.64 |
| IL-6 | 599.6 (51.8-9923.2) | 16 | 478.63 (44.9-1950.8) | 11 | 380.8 (158.2-5242.6) | 26 | 0.5 | 478.6 (44.9-1950.8) | 11 | 1661.8 (164.2-5982.13) | 10 | 353.7 (154.9-728.4) | 16 | 0.005 |
| IL-7 | 5.3 (0.8-17.4) | 11 | 7.86 (0.9-18.0) | 8 | 3.9 (0.9-17.5) | 13 | 0.68 | 7.8 (0.9-18.0) | 8 | 0.9 (0.9-2.3) | 3 | 7.0(0.9-17.45) | 10 | 0.14 |
| IP10 | 956.4 (8.1-14393.0) | 15 | 1429.2 (37.5-11132.5) | 11 | 2136.1 (37.5-14143.6) | 22 | 0.87 | 1429.2 (37.6-11132.5) | 11 | 1854.6 (35.0-14623.0) | 10 | 2512.5(79.97-7073.3) | 12 | 0.97 |
| MIG | 9486.7 (98.5-112202.8) | 11 | 22836.9 (298.8-155401.3) | 10 | 4783.2 (65.4-34802.5) | 22 | 0.11 | 22836.9 (298.8-155401.3) | 10 | 7040.5 (216.2-15193.8) | 9 | 3624.9 (38.8-37256.7) | 13 | 0.28 |

Acknowledgments

We thank Mr Manoel Gomes Fernandes from FUNASA and the State of Rio Grande do Norte Secretariat) for his assistance during the field studies.

The authors do not have commercial or other associations that might pose a conflict of interest

² These studies were funded by grant P50 AI-30639 from the US National Institutes of Health (RDP, MEW, and SMBJ), NIH grants R01 AI045540, R01 AI076233, R01AI067874 and R21 AI080801 (MEW) and by a Merit Review and OEF-OIF RFA grant from the Department of Veterans' Affairs (MEW), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (SMBJ).

³ This work has not previously been communicated in either poster or written form.

References

1. Pearson RD, Wheeler DA, Harrison LH, Kay HD (1983) The immunobiology of leishmaniasis. *Rev Infect Dis* 5: 907-27.
2. Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, et al. (1994) An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 386-8.
3. Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP (2001) Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 285-91.
4. Albuquerque PL, Silva Junior GB, Freire CC, Oliveira SB, Almeida DM, Silva HF, et al. (2009) Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceara, Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 26: 330-3.
5. Costa CH (2008) Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 24: 2959-63.
6. Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA (2008) Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica* 24:2941-7.
7. Jeronimo SM, Duggal P, Braz RF, Cheng C, Monteiro GR, Nascimento ET, et al. (2004) An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Scand J Infect Dis* 36: 443-9.
8. Nascimento EL, Martins DR, Monteiro GR, Barbosa JD, Ximenes MF, Maciel BL, et al. (2008) Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. *Cad Saude Publica* 24: 2964-7.
9. Carvalho EM, Teixeira RS, Johnson WD, Jr. (1981) Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect Immun* 33: 498-500.
10. Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM (2005) A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med* 201: 747-54.
11. Badaro R, Jones TC, Lorenzo R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. (1986) A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 154: 639-49.
12. Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa AA, et al. (1992) Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis* 166: 1124-32.

13. Skeiky YA, Benson DR, Guderian JA, Whittle JA, Bacelar O, Carvalho EM, et al. (1995) Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infect Immun* 63: 4105-14.
14. Bacellar O, Barral-Netto M, Badaro R, Carvalho EM (1991) Gamma interferon production by lymphocytes from children infected with *L. chagasi*. *Braz J Med Biol Res* 24:791-5.
15. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. (1986) New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 154: 1003-11.
16. Carvalho EM, Bacellar OA (1983) Lymphocyte reactivity to mitogens in American visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 16:35-41.
17. D'Oliveira JA, Costa SR, Barbosa AB, Orge MdL, Carvalho EM (1997) Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92:15-20.
18. Bacellar O, D'Oliveira A, Jr., Jeronimo S, Carvalho EM (2000) IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* 12:1228-31.
19. Jeronimo SM, Teixeira MJ, Sousa A, Thielking P, Pearson RD, Evans TG (2000) Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. *Clin Infect Dis* 30: 608-9.
20. Badaro R, Carvalho EM, Rocha H, Queiroz AC, Jones TC (1986) *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *Lancet* 1: 647-9.
21. Jeronimo SM, Duggal P, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Cabral AP, et al. (2007) Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. *J Infect Dis* 196: 1261-9.
22. Feitosa MF, Azevedo E, Lima AM, Krieger H (1999) Genetic causes involved in *Leishmania Chagasi* infection in northeastern - Brazil. *Genet Mol Biol* 22:1-5.
23. Bern C, Amann J, Haque R, Chowdhury R, Ali M, Kurkjian KM, et al. (2006) Loss of leishmanin skin test antigen sensitivity and potency in a longitudinal study of visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 75:744-8
24. Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, et al. (2002) The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 67: 344-8.
25. Jose FF, da Silva IM, Araujo MI, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM (2001) Evaluation of the sensitization power of Montenegro skin test]. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 537-42.

26. Barao SC, de Fonseca Camargo-Neves VL, Resende MR, da Silva LJ. (2007) Human asymptomatic infection in visceral leishmaniasis: a seroprevalence study in an urban area of low endemicity. Preliminary results. *Am J Trop Med Hyg* 77:1051-3.
27. Caldas AJ, Costa JM, Silva AA, Vinhas V, Barral A (2002) Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96:21-8.
28. Riera C, Fisa R, Lopez-Chejade P, Serra T, Girona E, Jimenez M, et al. 2008 Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* 48:1383-9.
29. Gidwani K, Rai M, Chakravarty J, Boelaert M, Sundar S (2009) Evaluation of leishmanin skin test in Indian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 80: 566-7.
30. Evans TG, Teixeira MJ, Sousa AQ, Pearson RD (1995) Short report: extended follow-up of the natural history of persons infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 53:360-1.
31. Carvalho EM, Badaro R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD, Jr. (1985) Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 76: 2066-9.
32. Crescente JA, Silveira FT, Lainson R, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE (2009) A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103:1250-6.
33. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de JA, Dutra WO, et al. (2002) Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-40.
34. Hailu A, Berhe N, Ali A, Gemetchu T (1997) Use of *Leishmania major* derived leishmanin for skin test surveys of visceral leishmaniasis in Ethiopia. *East Afr Med J* 74: 41-5.
35. Ali A, Ashford RW (1993) Visceral leishmaniasis in Ethiopia I. Cross-sectional leishmanin skin test in an endemic locality. *Ann Trop Med Parasitol* 87:157-61.
36. Reed SG, Badaro R, Masur H, Carvalho EM, Lorencó R, Lisboa A, et al. (1986) Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 35: 79-85.
37. Silveira FT, Lainson R, Crescente JA, de Souza AA, Campos MB, Gomes CM, et al. (2010) A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104:529-35.

38. Saran R, Gupta AK, Sharma MC (1991) Leishmanin skin test in clinical and subclinical kala-azar cases. *J Commun Dis* 23:135-7.
39. Moral L, Rubio EM, Moya M (2002) A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacanti region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96:129-32.
40. Zijlstra EE, Ali MS, El-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW (1992) Clinical aspects of kala-azar in children from the Sudan: a comparison with the disease in adults. *J Trop Pediatr* 38:17-21.
41. Gouvea MV, Werneck GL, Costa CH, de Amorim Carvalho FA (2007) Factors associated to Montenegro skin test positivity in Teresina, Brazil. *Acta Trop* 104:99-107.
42. Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Netto M, Badaro R, Rocha H, et al. (1992) Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *J Infect Dis* 165:535-40.
43. Maciel BL, Lacerda HG, Queiroz JW, Galvao J, Pontes NN, Dimenstein R, et al. (2008) Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 79: 591-8.
44. Costa CH, Gomes RB, Silva MR, Garcez LM, Ramos PK, Santos RS, et al. (2000) Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis* 182:997-1000.
45. Maroof A, Beattie L, Kirby A, Coles M, Kaye PM (2009) Dendritic cells matured by inflammation induce CD86-dependent priming of naive CD8+ T cells in the absence of their cognate peptide antigen. *J Immunol* 183:7095-103.
46. Sharma P, Gurumurthy S, Duncan R, Nakhasi HL, Salotra P (2009) Comparative in vivo expression of amastigote up regulated *Leishmania* genes in three different forms of Leishmaniasis. *Parasitol Int* Dec 4.
47. Nguyen Hoang AT, Liu H, Juarez J, Aziz N, Kaye PM, Svensson M (2010) Stromal cell-derived CXCL12 and CCL8 cooperate to support increased development of regulatory dendritic cells following *Leishmania* infection. *J Immunol* Aug 15;185(4):2360-71.
48. Ansari NA, Kumar R, Gautam S, Nysten S, Singh OP, Sundar S, et al. (2011) IL-27 and IL-21 Are Associated with T Cell IL-10 Responses in Human Visceral Leishmaniasis. *J Immunol* 186:3977-85.
49. Oghumu S, Lezama-Davila CM, Isaac-Marquez AP, Satoskar AR. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Exp Parasitol* 2010 Nov;126(3):389-96.
50. Stager S, Maroof A, Zubairi S, Sanos SL, Kopf M, Kaye PM (2006) Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 36:1764-71.

51. Gidwani K, Kumar R, Rai M, Sundar S (2009) Longitudinal seroepidemiologic study of visceral leishmaniasis in hyperendemic regions of Bihar, India. *Am J Trop Med Hyg* 80:345-6.
52. Spath GF, Lye LF, Segawa H, Sacks DL, Turco SJ, Beverley SM (2003) Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. *Science* 301:1241-3.
53. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420: 502-7.
54. Engwerda CR, Ato M, Kaye PM (2004) Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol* 20: 524-30.

8. Referências

- (1) Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog* 2005 Apr;38(4):147-60.
- (2) Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol* 2009 Jun;47(6):412-23.
- (3) Oghumu S, Lezama-Davila CM, Isaac-Marquez AP, Satoskar AR. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Exp Parasitol* 2010 Mar 3.
- (4) Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res* 2006 Mar;123(3):245-66.
- (5) Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007 Nov;51(2):229-42.
- (6) Roberts MT. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull* 2005;75-76:115-30.
- (7) Bacellar O, Barral-Netto M, Badaro R, Carvalho EM. Gamma interferon production by lymphocytes from children infected with *L. chagasi*. *Braz J Med Biol Res* 1991;24(8):791-5.
- (8) Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Netto M, Badaro R, Rocha H, et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *J Infect Dis* 1992 Mar;165(3):535-40.
- (9) Jeronimo SM, Teixeira MJ, Sousa A, Thielking P, Pearson RD, Evans TG. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. *Clin Infect Dis* 2000 Mar;30(3):608-9.
- (10) Cabello PH, Lima AM, Azevedo ES, Krieger H. Familial aggregation of *Leishmania chagasi* infection in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1995 Apr;52(4):364-5.
- (11) Jeronimo SM, Holst AK, Jamieson SE, Francis R, Martins DR, Bezerra FL, et al. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection 12. *Genes Immun* 2007 Oct;8(7):539-51.
- (12) Gontijo CMF, Melo MN. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospect. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2004;7.
- (13) Costa CH. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 2008 Dec;24(12):2959-63.

- (14) Marcondes CB, Pirmez C, Silva ES, Laurentino-Silva V, Steindel M, Santos AJ, et al. [A survey of visceral leishmaniasis in dogs from Santa Maria and neighbouring municipalities, State of Rio Grande do Sul]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003 Jul;36(4):499-501.
- (15) Werneck GL. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad Saude Publica* 2008 Dec;24(12):2937-40.
- (16) IBGE. Anuário Estatístico do Brasil 2008. Rio de Janeiro.: IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2008.
- (17) Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004 Sep;27(5):305-18.
- (18) Caldas AJ, Costa JM, Silva AA, Vinhas V, Barral A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002 Jan;96(1):21-8.
- (19) Crescente JA, Silveira FT, Lainson R, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009 Dec;103(12):1250-6.
- (20) Gouvea MV, Werneck GL, Costa CH, de Amorim Carvalho FA. Factors associated to Montenegro skin test positivity in Teresina, Brazil. *Acta Trop* 2007 Nov;104(2-3):99-107.
- (21) Jeronimo SM, Duggal P, Braz RF, Cheng C, Monteiro GR, Nascimento ET, et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Scand J Infect Dis* 2004;36(6-7):443-9.
- (22) Silveira FT, Lainson R, Pereira EA, De Souza AA, Campos MB, Chagas EJ, et al. A longitudinal study on the transmission dynamics of human *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil, with special reference to its prevalence and incidence. *Parasitol Res* 2009 Feb;104(3):559-67.
- (23) de G, V, de Assis TS, Orsini M, da Silva AR, de Souza GF, Caligiorne R, et al. Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic *Leishmania (Leishmania) chagasi* carriers who present modulated cytokine profiles. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008 Jun;102(6):548-55.
- (24) Bern C, Amann J, Haque R, Chowdhury R, Ali M, Kurkjian KM, et al. Loss of leishmanin skin test antigen sensitivity and potency in a longitudinal study of visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2006 Oct;75(4):744-8.
- (25) Desjeux P. *Leishmania* / HIV co-infections. *Afr Health* 1995 Nov;18(1):20-2.

- (26) Luz KG, Da S, V, Gomes EM, Machado FC, Araujo MA, Fonseca HE, et al. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. *Am J Trop Med Hyg* 1997 Aug;57(2):168-71.
- (27) Nascimento ET, Queiroz JW, Moura ML, Rego EF, Monteiro GRG, Pontes NNC, et al. The Emergence of Concurrent HIV-1/AIDS and Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011;105(5):298-300.
- (28) Gidwani K, Rai M, Chakravarty J, Boelaert M, Sundar S. Evaluation of leishmanin skin test in Indian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2009 Apr;80(4):566-7.
- (29) Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999 Oct 2;354(9185):1191-9.
- (30) Gibson ME. The identification of kala-azar and the discovery of *Leishmania donovani*. *Med Hist* 1983 Apr;27(2):203-13.
- (31) BAILEY H, BISHOP WJ. Leishman-Donovan bodies and donovaniasis; Sir William Boog Leishman, 1865-1926; Charles Donovan, 1863-1951. *Br J Vener Dis* 1959 Mar;35(1):8-9.
- (32) Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane LM, Deane G, Guimarães FN, et al. Leishmaniose Visceral Americana (Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1938;33:89-229.
- (33) Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica* 2008 Dec;24(12):2941-7.
- (34) Nascimento EL, Martins DR, Monteiro GR, Barbosa JD, Ximenes MF, Maciel BL, et al. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. *Cad Saude Publica* 2008 Dec;24(12):2964-7.
- (35) Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 2005 Oct;35(11-12):1169-80.
- (36) Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002 Aug;2(8):494-501.
- (37) Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007 Nov;5(11):873-82.
- (38) Magill AJ. Epidemiology of the leishmaniases. *Dermatol Clin* 1995 Jul;13(3):505-23.

- (39) OMS-Organização Mundial de Saúde, Organização Panamericana de Saúde. Manual de Controle de Leishmaniose Visceral. Brasília: 1997.
- (40) Singh RK, Pandey HP, Sundar S. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *Indian J Med Res* 2006 Mar;123(3):331-44.
- (41) Ahluwalia IB, Bern C, Costa C, Akter T, Chowdhury R, Ali M, et al. Visceral leishmaniasis: consequences of a neglected disease in a Bangladeshi community. *Am J Trop Med Hyg* 2003 Dec;69(6):624-8.
- (42) Seaman J, Mercer AJ, Sondorp HE, Herwaldt BL. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Ann Intern Med* 1996 Apr 1;124(7):664-72.
- (43) Dujardin JC, Campino L, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis* 2008 Jul;14(7):1013-8.
- (44) Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005 Dec;100(8):811-27.
- (45) Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 1994;10 Suppl 2:359-75.
- (46) Ministério da Saúde do Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse à Saúde Pública. *Boletim Eletrônico Epidemiológico* 2009;1:1-17.
- (47) Rede Interagencial de Informação para a Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde. Indicadores básicos para a saúde no Brasil: conceitos e aplicações. 2 ed. Brasília: 2008.
- (48) Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1962 May;4:198-212.
- (49) Ministério da Saúde do Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2008. 21-11-2009.
Ref Type: Internet Communication
- (50) Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994 Jul;88(4):386-8.
- (51) Queiroz PV, Monteiro GR, Macedo VP, Rocha MA, Batista LM, Queiroz JW, et al. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Res Vet Sci* 2009 Apr;86(2):267-73.

- (52) Mutinga MJ, Kamau CC, Basimike M, Mutero CM, Kyai FM. Studies on the epidemiology of leishmaniasis in Kenya: flight range of phlebotomine sandflies in Marigat, Baringo District. *East Afr Med J* 1992 Jan;69(1):9-13.
- (53) Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 2008 Dec;45(4):255-72.
- (54) Ximenes MF, Castellon EG, De Souza MF, Menezes AA, Queiroz JW, Macedo e Silva VP, et al. Effect of abiotic factors on seasonal population dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in northeastern Brazil. *J Med Entomol* 2006 Sep;43(5):990-5.
- (55) Ximenes MF, Silva VP, Queiroz PV, Rego MM, Cortez AM, Batista LM, et al. Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) and leishmaniasis in Rio Grande do Norte State Brazil: anthropic environment responses. *Neotrop Entomol* 2007 Jan;36(1):128-37.
- (56) Ximenes MF, Souza MF, Castellon EG. Density of sand flies (Diptera: psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral Leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil 5. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999 Jul;94(4):427-32.
- (57) Ministério da Saúde do Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Relatório de situação : Rio Grande do Norte. 3ª ed. Brasília: 2007.
- (58) Duarte I, Maciel BL, Monteiro GR, Queiroz JW, Nascimento ET, Lacerda HG, et al. Risk factors associated with *Leishmania* infection and the development of visceral leishmaniasis: the example of the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008;41(Suplemento III):168-71.
- (59) Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den BM, Canavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008 Apr;21(2):334-59, table.
- (60) Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 2003 Oct;97 Suppl 1:3-15.
- (61) Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Br Med Bull* 1972 Jan;28(1):44-8.
- (62) Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994 Jul;89(3):471-8.
- (63) Grimaldi G, Jr., David JR, Mahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1987 Mar;36(2):270-87.
- (64) Killick-Kendrick R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmaniae* and their phlebotomine vectors. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1985;78(5 Pt 2):747-55.

- (65) Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 2000 May;16(5):188-9.
- (66) Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 May 29;104(22):9375-80.
- (67) Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006 Aug;101(5):577-9.
- (68) Lainson R, Ryan L, Shaw JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987 Jul;82(3):421-4.
- (69) Gramiccia M, Gradoni L, Troiani M. HIV-*Leishmania* co-infections in Italy. Isoenzyme characterization of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992 Mar;86(2):161-3.
- (70) Camargo-Neves VL, Katz FG, Rodas LAC, Poletto DW, Spinola RMP, et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana -Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cadernos de Saúde Pública* 2001;15:1263-7.
- (71) Ashford RW, Desjeux P, Deraadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitol Today* 1992 Mar;8(3):104-5.
- (72) Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa AA, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis* 1992 Nov;166(5):1124-32.
- (73) Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* 1997 Nov;25(5):1240-2.
- (74) Dantas-Torres F, Brandao-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006 May;48(3):151-6.
- (75) Cabrera GP, Da S, V, da Costa RT, Reis AB, Mayrink W, Genaro O, et al. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1999 Aug;61(2):296-301.
- (76) Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Pelaez D, Diaz A, Montilla M, et al. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989 Mar;83(2):195.

- (77) Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review 1. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005 Dec;100(8):811-27.
- (78) Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 1996 Sep;14(5):417-23.
- (79) Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Ent* 1998;12:315-7.
- (80) Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet Parasitol* 2009 Mar 9;160(1-2):18-24.
- (81) Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramillo C, Llano R, Vélez ID. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), vector of visceral leishmaniasis in Northern Colombia. *J Med Entomol* 1996;33:278-85.
- (82) Young DG, Arias JR. Phlebotomine sandflies in the Americas. *Pan American Health Organization* 1991;33.
- (83) Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med* 2004 Sep;4(6):601-9.
- (84) Lainson R, Shaw JJ. Observations on the development of *Leishmania* (L.) *chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Ann Parasitol Hum Comp* 1988;63(2):134-45.
- (85) De Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003 Oct;98(7):861-70.
- (86) Mosser DM, Brittingham A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* 1997;115 Suppl:S9-23.
- (87) Rosenthal PJ, Chaisson RE, Hadley WK, Leech JH. Rectal leishmaniasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome 5. *Am J Med* 1988 Feb;84(2):307-9.
- (88) Dey A, Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J Med Microbiol* 2006 Jul;24(3):165-70.
- (89) Mpaka MA, Daniil Z, Kyriakou DS, Zakyntinos E. Septic shock due to visceral leishmaniasis, probably transmitted from blood transfusion. *J Infect Dev Ctries* 2009;3(6):479-83.

- (90) Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* 2006 Mar;123(3):357-88.
- (91) Chicharro C, Jimenez MI, Alvar J. Iso-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain. *Ann Trop Med Parasitol* 2003 Oct;97 Suppl 1:57-64.
- (92) Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodriguez A, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 2002 Mar 30;359(9312):1124-5.
- (93) Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune responses in kala-azar 1. *Indian J Med Res* 2006 Mar;123(3):245-66.
- (94) Brittingham A, Miller MA, Donelson JE, Wilson ME. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 2001 Jan 15;112(1):51-9.
- (95) Hermoso T, Fishelson Z, Becker SI, Hirschberg K, Jaffe CL. Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *EMBO J* 1991 Dec;10(13):4061-7.
- (96) Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SM, Nascimento ET, et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* 2001 Jul 15;167(2):893-901.
- (97) Gazzinelli RT, Talvani A, Camargo MM, Santiago HC, Oliveira MA, Vieira LQ, et al. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa 9. *Braz J Med Biol Res* 1998 Jan;31(1):89-104.
- (98) Goto H, Lindoso JA. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2004 Apr;37(4):615-23.
- (99) Brown DR, Reiner SL. Polarized helper-T-cell responses against *Leishmania major* in the absence of B cells. *Infect Immun* 1999 Jan;67(1):266-70.
- (100) Smelt SC, Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol* 2000 Apr 1;164(7):3681-8.
- (101) Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* 2005 Jun 15;99(1):17-23.
- (102) Arendse B, Van SJ, Brombacher F. IL-9 is a susceptibility factor in *Leishmania major* infection by promoting detrimental Th2/type 2 responses. *J Immunol* 2005 Feb 15;174(4):2205-11.

- (103) Scott P. Differentiation, regulation, and death of T helper cell subsets during infection with *Leishmania major*. *Immunol Res* 1998;17(1-2):229-38.
- (104) Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.
- (105) Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002 Dec 5;420(6915):502-7.
- (106) Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med* 2001 Nov 19;194(10):1497-506.
- (107) Nylen S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 2007 Sep;28(9):378-84.
- (108) Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* 2004 Jul 19;200(2):201-10.
- (109) Doganci A, Sauer K, Karwot R, Finotto S. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005 Jun;28(3):257-70.
- (110) Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003 Feb 14;299(5609):1033-6.
- (111) Stager S, Maroof A, Zubairi S, Sanos SL, Kopf M, Kaye PM. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2006 Jul;36(7):1764-71.
- (112) Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol* 2009 May;31(5):254-66.
- (113) Pearson RD, Cox G, Jeronimo SM, Castracane J, Drew JS, Evans T, et al. Visceral leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. *Am J Trop Med Hyg* 1992 Jul;47(1 Pt 2):8-15.
- (114) Ximenes MF, Silva VP, Queiroz PV, Rego MM, Cortez AM, Batista LM, et al. [Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) and leishmaniasis in Rio Grande do Norte State Brazil: anthropic environment responses]
1. *Neotrop Entomol* 2007 Jan;36(1):128-37.
- (115) Scott P. Finding *Leishmania*: a deadly game of hide-and-seek. *Cell Host Microbe* 2009 Jul 23;6(1):3-4.

- (116) Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006 May;116(5):1218-22.
- (117) Curtis MM, Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 2009 Feb;126(2):177-85.
- (118) Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 2009 Jul 1;200(1):75-8.
- (119) Lopez KS, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von SE. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol* 2009 Mar 1;182(5):3039-46.
- (120) Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest* 2009 Aug;119(8):2379-87.
- (121) Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2006 Jan;22(1):32-40.
- (122) ABBAS AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 5° ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
- (123) Scott P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol* 2005 Dec;7(12):1707-13.
- (124) Okwor I, Uzonna J. Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies. *Immunol Res* 2008;41(2):123-36.
- (125) Uzonna JE, Wei G, Yurkowski D, Bretscher P. Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease. *J Immunol* 2001 Dec 15;167(12):6967-74.
- (126) Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002 Dec 5;420(6915):502-7.
- (127) Zaph C, Uzonna J, Beverley SM, Scott P. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat Med* 2004 Oct;10(10):1104-10.
- (128) Badaro R, Jones TC, Lorenzo R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 1986 Oct;154(4):639-49.
- (129) Prata A, Silva LA. Calazar. In: Coura JR, editor. *Dinamica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 713-37.

- (130) Holaday BJ, Pompeu MM, Evans T, Braga DN, Texeira MJ, Sousa AQ, et al. Correlates of Leishmania-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis* 1993 Feb;167(2):411-7.
- (131) Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986 Dec;154(6):1003-11.
- (132) Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi* 12. *Am J Trop Med Hyg* 2002 Apr;66(4):334-7.
- (133) Gama ME, Costa JM, Gomes CM, Corbett CE. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004 Dec;99(8):889-93.
- (134) Kafetzis DA, Maltezou HC. Visceral leishmaniasis in paediatrics. *Curr Opin Infect Dis* 2002 Jun;15(3):289-94.
- (135) Kafetzis DA. An overview of paediatric leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003 Jan;49(1):31-8.
- (136) Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005 Oct 29;366(9496):1561-77.
- (137) Kafetzis DA, Maltezou HC. Visceral leishmaniasis in paediatrics. *Curr Opin Infect Dis* 2002 Jun;15(3):289-94.
- (138) Caldas AJ, Costa J, Aquino D, Silva AA, Barral-Netto M, Barral A. Are there differences in clinical and laboratory parameters between children and adults with American visceral leishmaniasis? *Acta Trop* 2006 Mar;97(3):252-8.
- (139) Duarte MI, da M, V, Corbett CE, Laurenti MD, Chebabo R, Goto H. Interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989 Jan;83(1):73-6.
- (140) Ministério da Saúde do Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 2006. Normas e Manuais Técnicos. Série A. 2006.
Ref Type: Generic
- (141) Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil 10. *Infection* 2003 Jun;31(3):174-7.
- (142) Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006 Mar;123(3):311-30.
- (143) Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002 Sep;9(5):951-8.

- (144) da Silva MR, Stewart JM, Costa CH. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis
8. *Am J Trop Med Hyg* 2005 Jun;72(6):811-4.
- (145) Reed SG. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1996 Sep;14(5):471-8.
- (146) Mandal J, Khurana S, Dubey ML, Bhatia P, Varma N, Malla N. Evaluation of direct agglutination test, rk39 Test, and ELISA for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2008 Jul;79(1):76-8.
- (147) De Almeida SL, Romero HD, Prata A, Costa RT, Nascimento E, Carvalho SF, et al. Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2006 Oct;75(4):739-43.
- (148) Badaro R, Reed SG, Barral A, Orge G, Jones TC. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am J Trop Med Hyg* 1986 Jan;35(1):72-8.
- (149) Badaro R. Progress of research in visceral leishmaniasis in the endemic area of Jacobina-Bahia 1934-1989. *Rev Soc Bras Med Trop* 1988 Oct;21(4):159-64.
- (150) Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade AS, et al. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005 Nov;38(6):456-63.
- (151) Moreno EC, Melo MN, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade AS, Antunes CM, et al. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006 Sep;39(5):421-7.
- (152) Nascimento MD, Souza EC, da Silva LM, Leal PC, Cantanhede KL, Bezerra GF, et al. [Prevalence of infection by *Leishmania chagasi* using ELISA (rK39 and CRUDE) and the Montenegro skin test in an endemic leishmaniasis area of Maranhao, Brazil]. *Cad Saude Publica* 2005 Nov;21(6):1801-7.
- (153) Burns JM, Jr., Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Jan 15;90(2):775-9.
- (154) Sivakumar R, Sharma P, Chang KP, Singh S. Cloning, expression, and purification of a novel recombinant antigen from *Leishmania donovani*. *Protein Expr Purif* 2006 Mar;46(1):156-65.
- (155) Sivakumar R, Dey A, Sharma P, Singh S. Expression and characterization of a recombinant kinesin antigen from an old Indian strain (DD8) of *Leishmania donovani* and comparing it with a commercially available antigen from a newly isolated (KE16) strain of *L. donovani*. *Infect Genet Evol* 2008 May;8(3):313-22.

- (156) Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002 Oct;67(4):344-8.
- (157) Schallig HD, Canto-Cavalheiro M, da Silva ES. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002 Oct;97(7):1015-8.
- (158) Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003 Mar;68(3):321-4.
- (159) de Assis TSM, Braga ASC, Pedras MJ. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol Serv Saúde* 2008;17(2):107-16.
- (160) Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1997 Oct;35(10):2454-7.
- (161) Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 2007 Jan;45(1):21-5.
- (162) da Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Brazil RP. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genet Mol Res* 2004;3(2):251-7.
- (163) Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2000 Jan;38(1):236-40.
- (164) Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, Bastien P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J Clin Microbiol* 2001 Feb;39(2):613-7.
- (165) Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *J Clin Microbiol* 2005 Jul;43(7):3038-41.
- (166) Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1994 Mar;32(3):746-9.
- (167) Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2003 Nov;41(11):5080-4.

- (168) Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 2004 Nov;42(11):5249-55.
- (169) Chappuis F, Rijal S, Jha UK, Desjeux P, Karki BM, Koirala S, et al. Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. *Trop Med Int Health* 2006 Jan;11(1):31-40.
- (170) Rijal S, Boelaert M, Regmi S, Karki BM, Jacquet D, Singh R, et al. Evaluation of a urinary antigen-based latex agglutination test in the diagnosis of kala-azar in eastern Nepal. *Trop Med Int Health* 2004 Jun;9(6):724-9.
- (171) Sundar S, Agrawal S, Pai K, Chance M, Hommel M. Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test. *Am J Trop Med Hyg* 2005 Aug;73(2):269-71.
- (172) Lange C, Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology* 2010 Feb;15(2):220-40.
- (173) Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med* 2008 Aug 5;149(3):177-84.
- (174) Hailu A, Menon JN, Berhe N, Gedamu L, Hassard TH, Kager PA, et al. Distinct immunity in patients with visceral leishmaniasis from that in subclinically infected and drug-cured people: implications for the mechanism underlying drug cure. *J Infect Dis* 2001 Jul 1;184(1):112-5.
- (175) Jeronimo SM, Holst AK, Jamieson SE, Francis R, Martins DR, Bezerra FL, et al. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. *Genes Immun* 2007 Oct;8(7):539-51.
- (176) Pineda JA, Macias J, Morillas F, Fernandez-Ochoa J, Cara J, de La RR, et al. False-positive results of leishmanin skin test due to phenol-containing diluent. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001 Mar;95(2):173-4.
- (177) Badaro R, Pedral-Sampaio D, Johnson WD, Jr., Reed SG. Evaluation of the stability of a soluble intradermal skin test antigen preparation in American visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990 Mar;84(2):226-7.
- (178) Reed SG, Badaro R, Masur H, Carvalho EM, Lorenzo R, Lisboa A, et al. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1986 Jan;35(1):79-85.
- (179) Evans TG, Teixeira MJ, Sousa AQ, Pearson RD. Short report: extended follow-up of the natural history of persons infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 1995 Oct;53(4):360-1.

- (180) Badaro R, Carvalho EM, Rocha H, Queiroz AC, Jones TC. *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *Lancet* 1986 Mar 22;1(8482):647-9.
- (181) de Onis M, Onyango A W, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bulletin of the World Health Organization* 85, 660-667.
Ref Type: Generic
- (182) Ministério da Saúde do Brasil, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde. Norma Técnica - SISVAN. 2008.
Ref Type: Data File
- (183) Durnin JV, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr* 1974 Jul;32(1):77-97.
- (184) Evans TG, Krug EC, Wilson ME, Vasconcelos AW, de Alencar JE, Pearson RD. Evaluation of antibody responses in American visceral leishmaniasis by ELISA and immunoblot. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989 Apr;84(2):157-66.
- (185) Garg R, Barat C, Ouellet M, Lodge R, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF-alpha. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3(5):e441.
- (186) Kurkjian KM, Mahmutovic AJ, Kellar KL, Haque R, Bern C, Secor WE. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. *Cytometry A* 2006 May;69(5):353-8.
- (187) Evans TG, Teixeira MJ, Sousa AQ, Pearson RD. Short report: extended follow-up of the natural history of persons infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 1995 Oct;53(4):360-1.
- (188) Antunes CM, Mayrink W, Magalhaes PA, Costa CA, Melo MN, Dias M, et al. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Epidemiol* 1986 Dec;15(4):572-80.
- (189) Khalil EA, El Hassan AM, Zijlstra EE, Mukhtar MM, Ghalib HW, Musa B, et al. Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* 2000 Nov 4;356(9241):1565-9.
- (190) Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, Khamesipour A, Zicker F, Ghassemi RL, et al. A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine* 1999 Feb 5;17(5):466-72.

- (191) Sharifi I, FeKri AR, Aflatonian MR, Khamesipour A, Nadim A, Mousavi MR, et al. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet* 1998 May 23;351(9115):1540-3.
- (192) Evans TG, Teixeira MJ, Sousa AQ, Pearson RD. Short report: extended follow-up of the natural history of persons infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 1995 Oct;53(4):360-1.
- (193) Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 2001 Aug;69(8):4709-18.
- (194) Maciel BL, Lacerda HG, Queiroz JW, Galvao J, Pontes NN, Dimenstein R, et al. Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 2008 Oct;79(4):591-8.
- (195) Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2010 Apr 30;17(4):332-41.
- (196) Sommer P, Sweeney G. Functional and mechanistic integration of infection and the metabolic syndrome. *Korean Diabetes J* 2010 Apr;34(2):71-6.
- (197) Lima ID, Queiroz JW, Lacerda HG, Queiroz PV, Pontes NN, Barbosa JD, et al. *Leishmania chagasi infantum* in northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. *Am J Trop Med Hyg* 2012;86(1):99-107.
- (198) Oliveira CC, Lacerda HG, Martins DR, Barbosa JD, Monteiro GR, Queiroz JW, et al. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Trop* 2004 Apr;90(2):155-62.
- (199) Schaefer KU, Kurtzhals JA, Gachihi GS, Muller AS, Kager PA. A prospective sero-epidemiological study of visceral leishmaniasis in Baringo District, Rift Valley Province, Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995 Sep;89(5):471-5.
- (200) Wu W, Weigand L, Mendez S. The IL-6-deficient mouse exhibits impaired lymphocytic responses to a vaccine combining live *Leishmania major* and CpG oligodeoxynucleotides. *Can J Microbiol* 2009 Jun;55(6):705-13.

9. ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a disease caused by protozoa of the *Leishmania donovani complex*, whose infection has clinical spectrum ranging from asymptomatic infection to active disease characterized by fever, cachexia, hepatosplenomegaly, and immunosuppression. The healing or protective immunity require an antigen-specific type 1. The Montenegro skin test (DTH) has been interpreted as a marker of protective immunity. However, there is no known correlation between the DTH response to type 1 and DTH and immunity of type 1 are maintained in the long term. Thus, a longitudinal study of 8 years, nested in a cohort family held in Brazil, documented the status of DTH and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in response to antigen-specific stimulation. This study was the interdisciplinary approach of physicians, biochemists, nutritionists, veterinary medicine, biology and statistics. The results show that 46.2% of subjects were analyzed DTH positive at baseline. The prevalence of positive and DTH induration size increased with age ($p = 0.0021$). 15.7% of individuals positive DTH "retro-converted" the negative and 50.4% (64) of individuals negative DTH became positive. The size of DTH induration was correlated significantly with the antigen-induced production of IFN- γ ($r = 0.6186$, $p = 0.0001$). IL-6 was secreted at higher levels in peripheral blood mononuclear cells of individuals who "retro-converted" DTH positive to negative than individuals who remained stable DTH status ($p = 0.005$). Thus, IFN- γ produced by peripheral blood mononuclear cells, may be a surrogate marker for protective immunity instead of the DTH response. In addition, differences in innate immune response may determine whether individuals maintain or eliminate the infection by *Leishmania infantum chagasi* in asymptomatic patients.