



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



**Augusto Marcelino Pedreira de Carvalho**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE À SALIVA DE  
FLEBÓTOMOS *Lutzomyia intermedia* EM INDIVÍDUOS  
RESIDENTES DE ÁREA ENDÊMICA DE  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

**Dissertação de Mestrado**

**Salvador (Bahia), 2013**



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



---

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE À SALIVA DE  
FLEBÓTOMOS *Lutzomyia intermedia* EM INDIVÍDUOS  
RESIDENTES DE ÁREA ENDÊMICA DE  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

**Augusto Marcelino Pedreira de Carvalho**

**Dissertação de Mestrado**

**Salvador (Bahia), 2013**



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



AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE À SALIVA DE  
FLEBÓTOMOS *Lutzomyia intermedia* EM INDIVÍDUOS  
RESIDENTES DE ÁREA ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR

Augusto Marcelino Pedreira de Carvalho

Professor-orientador: Professor Dra. Camila Indiani de Oliveira

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da área de concentração em Imunologia.

Salvador (Bahia), 2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,  
SIBI - UFBA.

C331 Carvalho, Augusto Marcelino Pedreira de  
Avaliação da resposta imune à saliva de flebótomos  
*Lutzomyia intermedia* em indivíduos residentes de área  
endêmica de leishmaniose tegumentar / Augusto Marcelino  
Pedreira de Carvalho. – Salvador, 2013.  
94 f.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Indiani de Oliveira.  
  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Faculdade de Medicina da Bahia, 2013.  
  
1. Imunologia. 2. *Lutzomyia intermedia*. 3. Saliva. I.  
Oliveira, Camila Indiani de. II. Universidade Federal da Bahia.  
III. Título.  
  
CDU 616.993.161

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

- Profa. Dra. Camila Alexandrina Viana de Figueirêdo, Doutora em Farmacologia – UFBA (Presidente);
- Profa. Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa, Doutora em Patologia Humana – FIOCRUZ
- Prof. Dr. Anderson Sá Nunes, Doutor em Imunologia Básica e Aplicada – USP

Membro Suplente:

- Profa. Dra. Camila Indiani de Oliveira, Doutora em Ciências – USP

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”*

*Albert Einstein*

*A minha família, amigos e namorada, por todo incentivo e apoio.*

# **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

## **Instituições**

- Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz.
  - Laboratório de Imunoparasitologia.
- Universidade Federal da Bahia.
  - Serviço de Imunologia, Complexo Universitário Professor Edgard Santos.
  - Centro de Referência em Leishmaniose Tegumentar Dr. Jackson Mauricio L. Costa.



## **EQUIPE**

- Dra. Camila Indiani de Oliveira, Tecnologista CPqGM-FIOCRUZ, Professora do PPgCS-UFBA.
- Juqueline Rocha Cristal, Mestranda do PPgCS-UFBA.
- Dra. Aldina Barral, Pesquisadora Titular do CPqGM- FIOCRUZ, Professora do PPgCS-UFBA.
- Dr. José Carlos Miranda, Pesquisador Titular do CPqGM- FIOCRUZ.
- Dr. Regis Gomes, Bolsista Jovem Talento, CPqGM-FIOCRUZ.
- Dr. Lucas Pedreira de Carvalho, Professor Adjunto da UFBA, Professor do PPgCS-UFBA.
- Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Professor Titular da UFBA, Professor do PPgCS-UFBA.
- Ednaldo Lago, agente de saúde, Corte de Pedra.
- Aline Muniz, doutoranda do PPgCS- UFBA.

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- National Institutes of Health (NIH).
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT-DT).
- Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra Camila Indiani de Oliveira, por todos ensinamentos, orientações, críticas e sugestões concedidas durante este período.

À Edgar Marcelino de Carvalho Filho, meu pai, meu amigo, meu ídolo. Por todas as horas de dedicação, ensinamentos e questionamentos.

À Iracema Pedreira de Carvalho, minha mãe e amiga, por todo incentivo, amor e dedicação.

À Lucas Pedreira de Carvalho, meu irmão e amigo, por todo incentivo, apoio e ajuda.

À Rodolfo Pedreira de Carvalho, meu irmão, pelo grande incentivo.

À Dra Aldina Barral, chefe do laboratório de Imunoparasitologia.

À Dr Regis Gomes, Juqueline Cristal e Dr José Carlos Miranda, colaboradores direto deste trabalho.

À todos os amigos e colegas do Lip-CPqGM e do Serviço de Imunologia.

À Ednaldo Lago e todos os funcionários do Posto de Saúde de Corte de Pedra.

À Camila Amorim, por todo amor, companheirismo e amizade sempre presentes ao longo dos anos.

# ÍNDICE

Índice de tabelas	12
Índice de figuras	13
Lista de abreviaturas	15
<b>Resumo</b>	<b>17</b>
<b>Objetivos</b>	<b>18</b>
<b>Introdução</b>	<b>19</b>
<b>Revisão da literatura</b>	<b>21</b>
1) Leishmaniose Tegumentar: Epidemiologia e resposta imune	21
2) Espécies e vetores das leishmanioses	24
3) Propriedades imunogênicas da saliva dos flebotomíneos	25
4) Influência da resposta imune contra a saliva no desfecho clínico da leishmaniose	28
<b>Casuística, material e métodos</b>	<b>30</b>
1) Desenho de estudo e seleção dos indivíduos	30
2) Teste de hipersensibilidade tardia para antígenos de <i>Leishmania</i>	31
3) Obtenção do sonicado de glândula salivar	31
4) Quantificação de IgG total contra antígenos da saliva de <i>Lu. intermedia</i>	32
5) Quantificação das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) contra antígenos da saliva de <i>Lu. intermedia</i>	32
6) Quantificação de IgE específica contra antígenos da saliva de <i>Lu. intermedia</i>	33
7) Western Blots	33
8) Obtenção, estímulo e cultura das CMSP	34
9) Determinação das concentrações de citocinas e quimiocinas	34
10) Citometria de fluxo	35
11) PCR em tempo real para a detecção de genes induzidos por IFN	35
12) Análises estatísticas	36
13) Aspectos éticos	37
14) Desenho experimental	38
<b>Resultados gerais</b>	<b>39</b>
1) IgG anti-saliva em indivíduos residentes em área endêmica e em controles	39

2) Dados demográficos e aspectos epidemiológicos da população de estudo	40
3) Subclasses de IgG anti-SGS em indivíduos residentes em área endêmica e expostos a saliva	41
4) IgE anti-saliva em indivíduos residentes em área endêmica	42
5) Reconhecimento das proteínas da saliva de <i>Lu. intermedia</i> por soros de indivíduos expostos	43
6) Perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por indivíduos residentes em área endêmica	44
7) Análise da frequência das subpopulações de células T CD4 <sup>+</sup> , (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ) e (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> )	49
8) Análise da frequência das subpopulações de células T CD4 <sup>+</sup> , (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ) e (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> ) positivas para IL-10	51
9) Comparação entre a resposta imune humoral contra antígenos da saliva de <i>Lu. intermedia</i> e resposta imune celular a <i>Leishmania</i> (DTH)	53
10) Análise do risco relativo de desenvolver LC	55
<b>Discussão</b>	<b>56</b>
<b>Perspectivas de estudo</b>	<b>61</b>
<b>Conclusões</b>	<b>63</b>
<b>Summary</b>	<b>64</b>
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>65</b>
<b>Anexos</b>	<b>72</b>
ANEXO 1. Questionário de dados demográficos e epidemiológicos	73
ANEXO 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	79
ANEXO 3. Ofício do Comitê de ética	85
ANEXO 4. Normas de publicação da revista	87

## INDICE DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Espécies de <i>Leishmania</i> , formas clínicas e principais vetores.	24
<b>TABELA 2.</b> Dados demográficos e epidemiológicos de indivíduos residentes em área endêmica, expostos ou não a saliva de <i>Lu. intermedia</i> .	40

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Resposta humoral anti-saliva de <i>Lu. intermedia</i> de indivíduos naturalmente expostos à <i>Lu. intermedia</i> .	39
<b>FIGURA 2.</b> Subclasses de IgG anti-saliva em indivíduos naturalmente expostos a <i>Lu intermedia</i> .	41
<b>FIGURA 3.</b> IgE anti-saliva em indivíduos naturalmente expostos a <i>Lu intermedia</i> .	42
<b>FIGURA 4.</b> Detecção de proteínas presentes na saliva de <i>Lu. intermedia</i> por Western blot, em indivíduos naturalmente expostos.	43
<b>FIGURA 5.</b> Concentração de citocinas no sobrenadante de culturas de células de indivíduos com sorologia positiva e negativa para SGS de <i>Lu. intermedia</i> .	45
<b>FIGURA 6.</b> Razão da produção de citocinas no sobrenadante de culturas de células de indivíduos com sorologia positiva para SGS de <i>Lu. intermedia</i> .	46
<b>FIGURA 7.</b> Concentração de quimiocinas no sobrenadante de culturas de células de indivíduos com sorologia positiva e negativa para SGS de <i>Lu. intermedia</i> .	47
<b>FIGURA 8.</b> Expressão de genes induzidos por IFN em indivíduos com sorologia positiva e negativa para SGS de <i>Lu. intermedia</i> .	48
<b>FIGURA 9.</b> Frequência das subpopulações de células T CD4 <sup>+</sup> (CD25 <sup>+</sup> ) e (CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> ) em indivíduos com sorologia positiva para SGS de <i>Lu. intermedia</i> .	50
<b>FIGURA 10.</b> Frequências de células T CD4 <sup>+</sup> e suas subpopulações	52

(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) e (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) positivas para IL-10.

**FIGURA 11.** IgG anti-saliva em indivíduos com LC ativa, e com ou não 53  
resposta imune celular à *Leishmania*.

**FIGURA 12.** Detecção de proteínas presentes na saliva de *Lu. intermedia* por 54  
Western blot em indivíduos portadores ou não de resposta celular anti-  
*Leishmania*.



## LISTA DE ABREVIATURAS

**CD** – Cluster of differentiation (Grupo de diferenciação)

**CMSP** – Células mononucleares do sangue periférico

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DTH** – Delay type Hypersensitivity (Teste de hipersensibilidade tardia)

**ELISA** – Enzyme Linked Immunoasorbent assay (Ensaio imunoenzimático).

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**IFN- $\gamma$**  – Interferon  $\gamma$

**IL** – Interlekin (Interleucina)

**LC** – Leishmaniose cutânea

**LD** – Leishmaniose disseminada

**LM** – Leishmaniose mucosa

**LT** – Leishmaniose tegumentar

**LV** – Leishmaniose visceral

**NK** – Células matadoras naturais

**NO** – Óxido nítrico

**OMS** – Organização mundial de Saúde

**PCR** – Reação de polimerização em cadeia

**RNA** – Ácido ribonucleico

**SGS** – Sonicado de glândula salivar

**SLA** – Soluble *Leishmania* antigen (Antígeno solúvel de *Leishmania*)

**TGF- $\beta$**  – Transforming growth factor beta (Fator de transformação do crescimento beta)

**Th1** – Células T auxiliaadoras do tipo 1

**Th2** – Células T auxiliaadoras do tipo 2

**TNF** – Tumor necrosis fator (Fator de necrose tumoral)

## RESUMO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE À SALIVA DE FLEBÓTOMOS *Lutzomyia intermedia* EM INDIVÍDUOS RESIDENTES DE ÁREA ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.** A saliva dos flebotomíneos possui uma variedade de agentes farmacológicos, como anticoagulantes, vasodilatadores além de moléculas imunomoduladoras e anti-inflamatórias. Diferente de outras interações parasito/vetor, a imunização de camundongos com a saliva de *Lu. intermedia*, um dos vetores da *Leishmania braziliensis* no Brasil, aumenta a infecção por *Leishmania*. Em adição, pacientes com úlcera ativa apresentam altos títulos de anticorpos anti-saliva de *Lu. intermedia* quando comparados com indivíduos com a forma subclínica da infecção por *L. braziliensis*, sugerindo que a exposição a saliva do flebótomo influencia o desfecho da infecção por *L. braziliensis*. No presente estudo nós caracterizamos a resposta imune contra a saliva de *Lu. intermedia* em residentes de área de transmissão de *L. braziliensis*. Participaram desse estudo 264 moradores de Corte de Pedra, Bahia, nos quais foi avaliada a resposta imune humoral e celular contra antígenos da saliva de *Lu. intermedia*. Anticorpos anti-saliva foram encontrados em 150 (56.8%) indivíduos e a sorologia positiva foi associada com a chegada em casa após as 16h ( $p=0,01$ ). Além disso, houve uma predominância das subclasses de IgG: IgG1 e IgG4. A produção das citocinas e quimiocinas foi determinada nos sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) estimuladas com a saliva. Indivíduos expostos apresentaram concentrações mais elevadas de IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$  quando comparados aos controles, enquanto as concentrações de TNF foram similares nos dois grupos. Em adição, indivíduos expostos à saliva do vetor produziram concentrações mais elevadas de CXCL9 e CCL2. Adicionalmente, a principal fonte de IL-10 são as células T CD4<sup>+</sup>, incluindo suas subpopulações CD25<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup>. É possível que esse tipo de resposta imune, com altas produções de IL-10 e IL-13, favoreça a proliferação do parasita contribuindo para a exacerbação da infecção por *L. braziliensis*. Além disso, nós também observamos que indivíduos com Leishmaniose Cutânea (LC) apresentam altos títulos de anticorpos anti-saliva quando comparados com indivíduos que apresentavam resposta imune celular à *Leishmania* ( $p<0.05$ ), sugerindo uma associação entre a exposição à saliva de *Lu. intermedia* e risco de desenvolver a Leishmaniose. De fato, analisando os 231 indivíduos residentes de Corte de Pedra com resposta celular negativa para *Leishmania* (em 2010), nós observamos que 23 (9,9%) desenvolveram LC, e destes, 14 (60,8%) apresentaram sorologia positiva para antígenos da saliva de *Lu. Intermedia*. Esses resultados implicam que o risco de desenvolver LC é 11% maior nos indivíduos expostos a saliva de *Lu. Intermedia*.

**Palavras-chave:** Resposta imune, *Lutzomyia intermedia*, saliva.

## OBJETIVOS

### Geral

Caracterizar a resposta imune contra antígenos da saliva de *Lutzomyia intermedia* em indivíduos residentes em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar.

### Específicos

- Caracterizar a resposta imune humoral à saliva de *Lu. intermedia* em indivíduos residentes em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar.
- Caracterizar a resposta imune celular à saliva de *Lu. intermedia* em indivíduos residentes em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar.
- Avaliar a existência de associação entre resposta imune humoral contra antígenos da saliva de *Lu. intermedia* e resposta imune celular a *Leishmania* (DTH).
- Avaliar se a resposta imune humoral anti-saliva de *Lu. intermedia* possui influência no desfecho clínico da infecção por *L. braziliensis*.

## INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. As Leishmanioses estão presentes em diversos países, estima-se que 350 milhões de pessoas estão sob risco de contrair a doença e que a incidência anual está em torno de 1,5-2 milhões de casos novos (Alvar et al., 2012). Entre as formas clínicas de Leishmaniose, podemos destacar a Leishmaniose Tegumentar (LT) e a Leishmaniose Visceral (LV). A principal espécie que causa a LT no Brasil é a *Leishmania braziliensis* e fatores relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro desempenham um papel central na patogênese das leishmanioses.

A transmissão da *Leishmania* ocorre durante o repasto sanguíneo de um flebotomíneo fêmea, infectado pelo parasita. Durante este processo a saliva do flebotomíneo (vetor) é inoculada concomitantemente ao protozoário. A saliva do vetor possui diversas substâncias que atuam na homeostase do hospedeiro, mas que, em paralelo, também podem ser imunogênicas. Estudos iniciais avaliando os efeitos da saliva do flebótomo no curso da infecção por *Leishmania* mostraram que a co-inoculação do sonicado de glândulas salivares (SGS) de espécies de vetores tais como *Lutzomyia longipalpis* ou *Phlebotomus papatasi* resultou em uma exacerbação significativa do tamanho da lesão e da carga parasitária, em modelos experimentais de infecção (Titus et al., 1988; Samuelson et al., 1991; Belkaid et al., 1998). Por outro lado, a pré-exposição a estes mesmos antígenos foi capaz de conferir proteção contra um desafio subsequente com *Leishmania* (Belkaid et al., 1998; Kamhawi et al., 2000; Valenzuela et al., 2001). De outra forma, a prévia inoculação do SGS de *Lu. intermedia* não conferiu proteção contra a *L. braziliensis*, também em modelo experimental de infecção (De Moura et al., 2007). Estes dados indicam que a resposta anti-saliva de *Lu. intermedia*, um dos principais vetores da *L. braziliensis*, é diferente daquela encontrada em outras associações parasita-vetor-hospedeiro. Adicionalmente foi visto que pacientes com LT ativa possuem títulos mais elevados de anticorpos contra SGS de *Lu. intermedia* quando comparado a indivíduos expostos, mas sem sintomas clínicos (De Moura et al., 2007). Portanto, é possível que a resposta imune a antígenos presentes na saliva de *Lu. intermedia* influencie o desfecho da infecção por *L. braziliensis*.

Com relação ao hospedeiro é conhecido o importante papel da resposta Th1 e a consequente produção de IFN- $\gamma$  e ativação macrofágica no controle da infecção causada pela

*Leishmania*. Todavia, na LT causada pela *L. braziliensis* existem evidências de que a patogênese da doença está associada a uma resposta imune celular exagerada com produção elevada de TNF, IFN- $\gamma$  e desenvolvimento de lesão tecidual. No entanto, existem indivíduos que são infectados por *L. braziliensis*, mas que controlam a infecção e não desenvolvem doença. Admite-se que os eventos iniciais da resposta imune, logo após a penetração do parasito, podem determinar o desfecho da infecção. Neste contexto além do parasito e do hospedeiro, fatores relacionados ao vetor também podem contribuir para o controle ou para a progressão da infecção. Com isso a nossa hipótese é que a resposta imune do hospedeiro humano contra a saliva do vetor *Lu. intermedia* influencia o desfecho clínico da infecção por *L. braziliensis*.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1) LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: EPIDEMIOLOGIA E RESPOSTA IMUNE

A importância da Leishmaniose Tegumentar (LT) como um grande problema de saúde pública mundial levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incluí-la entre as seis doenças consideradas prioritárias no controle de saúde pública do órgão. No continente americano a LT espalha-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, as três principais espécies que causam LT são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e são reportados aproximadamente 30.000 casos novos de LT por ano (WHO, 2010; Brasil, 2007).

A infecção por *L. braziliensis* resulta em três formas clínicas distintas. A Leishmaniose Cutânea (LC) é caracterizada por uma ou mais úlceras tegumentares bem delimitadas de bordas elevadas e fundo granuloso (Llanos Cuentas et al., 1984). A evolução clínica da LC é descrita primeiramente com o aparecimento de uma linfadenopatia seguida pela formação de uma pápula e enfim o aparecimento da úlcera (Barral et al., 1992; Barral et al., 1995). A Leishmaniose Mucosa (LM) é definida por lesões que atingem a mucosa nasal podendo também envolver boca, laringe e faringe. A Leishmaniose Disseminada (LD) caracteriza-se pela presença de dez ou mais lesões papulosas, acneiformes e ulceradas em duas ou mais áreas distintas do corpo (Turetz et al., 2002). Em Corte de Pedra, área de transmissão de *L. braziliensis* situada a cerca de 300 km da cidade de Salvador, a LC representa cerca de 90% dos casos de LT, enquanto a LM e a LD representam aproximadamente 4,5 e 2,5% dos casos respectivamente (Jirmanus et al., 2012). Adicionalmente, em áreas de transmissão de *L. braziliensis* cerca de 10% dos indivíduos sem história de doença ativa ou pregressa apresentam uma reação de Montenegro, teste intradérmico de hipersensibilidade tardia com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), positivo, apresentando a forma denominada subclínica da infecção (Follador et al., 2002).

Por se tratar de um organismo intracelular, o controle da infecção por *Leishmania* é feito principalmente pela produção de IFN- $\gamma$ , necessária para ativação de macrófagos,

induzindo consequente produção de IL-12, TNF e síntese de derivados de O<sub>2</sub>, a exemplo do óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Scott et al., 1983; Sher et al., 1983; Scott et al., 1989). Essa resposta com o perfil Th1 é necessária para que haja o controle da replicação parasitária. Por outro lado uma forte resposta inflamatória pode ser a causa do dano tecidual (Ribeiro de Jesus et al., 1998; Bacellar et al., 2002). Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LC e LM causadas por *L. braziliensis* secretam altas concentrações de IFN- $\gamma$  e TNF em resposta ao antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) (Carvalho et al., 1985; Bacellar et al., 2002). A célula T CD4<sup>+</sup> é a que mais contribui para a produção de IFN- $\gamma$  (Bacellar et al., 2002; Faria et al., 2005) e esta resposta inflamatória exagerada está também presente *in situ*, nas lesões de LC e LM (Faria et al., 2005).

Ao longo do tempo, diversas evidências têm sido acumuladas de que a resposta inflamatória exagerada contribui para o desenvolvimento das lesões presentes na LC e LM: 1) O dano tecidual está associado com um infiltrado de linfócitos e macrófagos e com pouca presença de parasitas (Bittencourt et al., 1991); 2) Expressão de TNF e NO estão correlacionados positivamente com o tamanho da lesão e a extensão do infiltrado inflamatório (Antonelli et al., 2005; Oliveira et al., 2011); 3) O tratamento de pacientes com lesão inicial não previne o aparecimento da úlcera clássica da LC (Machado et al., 2002); 4) Moléculas que modulam a resposta imunológica, associadas ao antimonial, aceleram o processo de cura (Almeida et al., 1999; Lessa et al., 2001; Báfica et al., 2003; Machado et al., 2007) e 5) Indivíduos assintomáticos apresentam concentrações mais baixas de IFN- $\gamma$  e TNF (Follador et al., 2002).

Outra citocina importante que pode influenciar o tipo de resposta do hospedeiro à infecção por *Leishmania* é a IL-10. Foi documentado que CMSP de indivíduos com fase inicial da LC (antes do aparecimento da úlcera) secretam baixas concentrações de IFN- $\gamma$  e TNF e altas concentrações de IL-10 quando estimuladas com SLA. Além disso, quando a IL-10 é neutralizada, ocorre um aumento na produção de IFN- $\gamma$  (Rocha et al., 1999; Uger et al., 2009). Todavia, quando as lesões de LC e LM já estão formadas, a adição da IL-10 exógena não é capaz de suprimir a forte resposta inflamatória (Bacellar et al., 2002). Mesmo com a presença de células T reguladoras expressando IL-10 *in situ* (Campanelli et al., 2006; Costa et al., 2013), é possível que a diminuição na expressão do receptor de IL-10 em lesões de LM previna a modulação da resposta inflamatória exacerbada (Faria et al., 2005).



As células T CD8<sup>+</sup> também participam da resposta imune contra a *Leishmania*. Embora a citotoxicidade seja um mecanismo de defesa contra agentes intracelulares, na infecção por *L. braziliensis* as células TCD8<sup>+</sup> destroem células infectadas pelo parasita e promovem patologia (Barral-netto et al., 1995; Brodskyn et al., 1997; Novais et al., 2013). Adicionalmente, o desenvolvimento da lesão cutânea se associa com o aumento da frequência de células T CD8<sup>+</sup> e o aumento de células T CD8<sup>+</sup> expressando granzima a nível tecidual (Faria et al., 2005). Recentemente, uma dicotomia foi proposta, segundo a qual as células T CD8<sup>+</sup> granzima B<sup>+</sup> promovem a lesão tecidual e as células T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> promovem destruição do parasita (Santos et al., 2013).

A forma subclínica da LT é caracterizada por uma reação de Montenegro positiva e pelo desenvolvimento de uma resposta imune capaz de controlar a multiplicação parasitária e ao mesmo tempo não induzir um dano tecidual. Além da produção de IFN- $\gamma$  e de TNF ser menor em indivíduos subclínicos, há uma maior produção de IL-10 nesse grupo, quando comparado a pacientes com LC (Bittar et al., 2007). Outra possibilidade é que indivíduos com a forma subclínica controlem a infecção através da resposta imune inata. Nesse contexto, foi mostrado que macrófagos de indivíduos subclínicos eliminam a *L. braziliensis* de maneira mais eficiente do que macrófagos de pacientes com LC (Giudice et al., 2012).

## 2) ESPÉCIES E VETORES DAS LEISHMANIOSES

A *Leishmania* possui um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores. A transmissão da *Leishmania* ocorre através do repasto sanguíneo de flebotomos fêmeas, momento no qual a forma infectante do parasita, promastigota metacíclica, é injetada no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva do vetor. Essa forma se diferencia na forma amastigota que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. Os flebotomíneos transmissores da *Leishmania* pertencem à ordem Diptera e existem dois gêneros de importância médica, *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Tabela 1).

**Tabela 1. Espécies de *Leishmania*, formas clínicas e principais vetores.**

Espécies de <i>Leishmania</i>	Forma clínica	Espécies de flebotomíneos
<i>Leishmania infantum chagasi</i>	LV	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Lutzomyia evansi</i>
<i>Leishmania infantum</i>	LV, LC	<i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>Phlebotomus ariasi</i> , <i>Phlebotomus tobbi</i> , <i>Phlebotomus neglectus</i>
<i>Leishmania donovani</i>	LV	<i>Phlebotomus argentipes</i> , <i>Phlebotomus orientalis</i> , <i>Phlebotomus martini</i>
<i>Leishmania tropica</i>	LC	<i>Phlebotomus sergenti</i>
<i>Leishmania major</i>	LC	<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Phlebotomus duboscqi</i> , <i>Phlebotomus salehi</i> , <i>Phlebotomus bergeroti</i>
<i>Leishmania braziliensis</i>	LC, ML, LD	<i>Lutzomyia intermedia</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i> , <i>Lutzomyia migonei</i> , <i>Lutzomyia wellcomei</i> , <i>Lutzomyia ovallesi</i>
<i>Leishmania amazonensis</i>	LC, LCD	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>
<i>Leishmania guyanensis</i>	LC, LM	<i>Lutzomyia umbratilis</i> , <i>Lutzomyia anduzei</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i>
<i>Leishmania mexicana</i>	LC, LCD	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i> , <i>Lutzomyia shannoni</i> , <i>Lutzomyia diabolica</i>

### 3) PROPRIEDADES IMUNOGÊNICAS DA SALIVA DOS FLEBOTOMÍNEOS

A saliva dos flebotomíneos possui diversos agentes farmacológicos com atividade anti-coagulante, anti-agregação plaquetária e/ou vasodilatadora que facilitam a captação do sangue do hospedeiro pelo vetor (Charlab et al., 1999; Sacks et al., 2001). O Maxadilan, um potente vasodilatador, foi a primeira molécula descrita na saliva de flebotomíneos (Lerner et al., 1991; Ribeiro et al., 1989). O Maxadilan é capaz de exacerbar a infecção experimental por *L. major* (Morris et al., 2001) e a adição do Maxadilan a macrófagos murinos induz a produção de IL-10 e de TGF- $\beta$ , além de possuir efeito supressor na produção de IL-12p70, TNF e óxido nítrico (Brodie et al., 2007). Adicionalmente, essa proteína possui efeito sobre as células dendríticas, promovendo uma redução de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86), assim como a expressão de CCR7 e aumento da secreção de citocinas do tipo Th2 (Wheat et al., 2008). Outra proteína presente na saliva de algumas espécies de flebotomos é a adenosina (Carregaro et al., 2011; Moura et al., 2013). É sabido que a adenosina é um componente imunomodulador da saliva do vetor, pois induz a produção de IL-10 e suprime a produção de IL-12 e TNF (Hasko et al., 1996; Hasko et al., 2000), além de suprimir a produção de óxido nítrico por macrófagos (Katz et al., 2000). Ademais, a adenosina da saliva de *P. papatasi* foi testada como um agente imunomodulador em modelo murino de artrite, induzindo uma atenuação da doença inflamatória (Carregaro et al., 2011).

O crescimento no interesse do estudo da saliva do vetor ocorreu após documentação de que a infecção por *L. major* é exacerbada pela presença da saliva de *Lu. longipalpis* (Titus et al., 1988). Neste trabalho clássico, foi visto que a co-inoculação de *L. major* juntamente com SGS de *Lu. longipalpis* induz um aumento significativo da lesão e da carga parasitária (Titus et al., 1988). Posteriormente foi documentado também que a co-inoculação de *L. major* juntamente com o SGS de *P. papatasi* favorece a progressão da doença em camundongos C57BL/6 (Theodos et al., 1991; Belkaid et al., 1998). Nesse caso, o desfecho clínico foi associado com o aumento da produção de citocinas Th2 na fase inicial da infecção (Belkaid et al., 1998). Em adição, o SGS de *P. papatasi* também exacerba a lesão por *L. major* em camundongos CBA e a exacerbação da doença foi correlacionada com a inibição da produção de IFN- $\gamma$ , IL-12 e da enzima óxido nítrico sintase induzível além de um aumento da produção de IL-4 (Mbow et al., 1998). Em outro trabalho, observou-se que a saliva de *Lu.*

*longipalpis* aumenta a infecção por *L. amazonensis*, induzindo lesões maiores e uma carga parasitária mais elevada (Norsworthy et al., 2004). Nesse caso, camundongos co-inoculados com o parasita e o SGS apresentaram expressão de IL-10 mais elevada no tecido além de um aumento da frequência de células T CD4+ e T CD8+ expressando IL-10 no linfonodo drenante (Norsworthy et al., 2004). Com relação à infecção por *L. braziliensis*, também foi mostrado que o SGS *Lu. longipalpis* (Samuelson et al., 1991) e de *Lu. whitmani* (Bezerra et al., 2001) induzem um aumento da infecção por esse parasita.

Após a observação de que a inoculação do parasita junto com a saliva do vetor exacerba a infecção, formulou-se a hipótese de que a prévia exposição à saliva pudesse controlar uma infecção subsequente com *Leishmania* (Belkaid et al., 1998). De fato, foi mostrado que a sensibilização com o SGS de *P. papatasi* protege camundongos BALB/c ou C57BL/6 contra um desafio subsequente com *L. major* (Belkaid et al., 1998). Posteriormente, foi mostrado que a exposição a picadas de *P. papatasi* não infectados também confere proteção contra *L. major* e essa proteção foi associada com o aparecimento de uma forte reação de DTH para antígenos salivares e com a produção de IFN- $\gamma$  após estímulo com SGS (Kamhawi et al., 2000). A partir deste momento, maior atenção foi dada às moléculas da saliva, uma vez que elas poderiam ser possíveis candidatas a uma vacina contra a doença. Foi relatado que camundongos imunizados com um plasmídeo de DNA que codifica a proteína PpSP15 (presente na saliva de *P. papatasi*) foram protegidos contra o desafio com *L. major* (Valenzuela et al., 2001). Além disso, foi mostrado nesse trabalho que camundongos deficientes de células B também foram protegidos, estabelecendo a resposta imune celular como mecanismo responsável pela proteção (Valenzuela et al., 2001). De maneira similar, a pré-exposição à proteína LJM19, presente na saliva de *Lu. longipalpis*, foi capaz de conferir proteção contra *L. infantum-chagasi* (Gomes et al., 2008), em modelo experimental de LV. Adicionalmente, em outro trabalho foi mostrado que a imunização com o SGS de *Lu. longipalpis* ou com a proteína LJM19 também confere proteção contra um desafio composto por *L. braziliensis* + saliva de *Lu. intermedia*, sugerindo a possibilidade do uso de um componente da saliva de um vetor em uma vacina contra diversas espécies de *Leishmania* (Tavares et al., 2011). A imunização com plasmídeos de DNA que codificam duas proteínas da saliva de *Lu. longipalpis* (LJM17 e LJM143) ou a imunização com as respectivas proteínas recombinantes resultou em uma forte resposta Th1, com grande produção de IFN- $\gamma$  *in vitro* e *in situ*, em modelo canino (Collin et al., 2009). Além disso, macrófagos infectados com *L. infantum-chagasi* eliminaram o parasita de maneira eficiente, quando colocados em cultura

com linfócitos autólogos de animais imunizados com LJM17 e LJM143 (Collin et al., 2009). Em um estudo recente, camundongos imunizados com LJM11 não desenvolveram lesão após desafio com flebótomos infectados com *L. major* e os autores mostraram que a proteção se correlaciona com a produção aumentada de IFN- $\gamma$  (Gomes et al., 2012).

A inoculação do SGS de *Lu. intermedia* em camundongos BALB/c induziu um rápido recrutamento de macrófagos e neutrófilos além de um aumento da expressão de CXCL1, CCL2, CCL4 e TNF (De Moura et al., 2010). Adicionalmente, monócitos humanos estimulados com a saliva de *Lu. intermedia* e expostos a *L. braziliensis* apresentam um aumento da produção de TNF, IL-6 e IL-8 (Menezes et al., 2008). De maneira diferente das outras interações parasita/vetor, a prévia inoculação do SGS de *Lu. intermedia* levou ao aumento da infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c (De Moura et al., 2007). Além disso, animais imunizados com a saliva de *Lu. intermedia* apresentaram uma resposta imune celular mista, com presença de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 (De Moura et al., 2007). Contudo, como a saliva do vetor possui diversas proteínas, é possível que cada proteína induza um perfil de resposta imune. Nesse contexto, camundongos imunizados com plasmídeo de DNA codificando para a proteína Linb11 (proteína da saliva de *Lu. intermedia*) e desafiados com a *L. braziliensis* apresentaram uma redução da carga parasitária correlacionada com aumento na produção de IFN- $\gamma$  (De Moura et al., 2013).

## 5) INFLUÊNCIA DA RESPOSTA IMUNE CONTRA A SALIVA NO DESFECHO CLÍNICO DA LEISHMANIOSE

Estudos em área endêmica de LV no Brasil mostraram uma associação entre anticorpos anti-SGS de *Lu. longipalpis* e presença de resposta imune celular contra a *Leishmania* (Barral et al., 2000). Além disso, foi mostrado o aparecimento simultâneo da resposta humoral anti-saliva e a resposta celular para o parasita (caracterizada pela presença do DTH) (Gomes et al., 2002) e, empregando uma coorte prospectiva, foi mostrado que a incidência de DTH para antígenos do parasita foi maior em indivíduos que possuíam IgG anti-SGS de *Lu. longipalpis* (Aquino et al., 2010). Adicionalmente, outro estudo mostrou que indivíduos expostos experimentalmente a picadas de *Lu. longipalpis* apresentam resposta imune celular, com grande produção de IFN- $\gamma$  e aparecimento de reação de hipersensibilidade tardia a antígenos da saliva (Vinhas et al., 2007). Mais importante, a co-cultura de macrófagos infectados por *L. infantum-chagasi* com linfócitos autólogos estimulados com SGS reduziu de maneira significativa o número de amastigotas nos macrófagos (Vinhas et al., 2007). Juntos, esses dados dão suporte à hipótese de que a exposição a antígenos da saliva de *Lu. longipalpis* contribui para proteção contra *L. infantum*. Todavia, em humanos não está claro se a proteção é devido à neutralização de proteínas da saliva por anticorpos ou devido ao aparecimento de uma resposta imune celular em momentos iniciais após a picada de flebótomos infectados.

Alternativamente, na Turquia, em área de transmissão de *L. tropica*, pacientes com LC ativa apresentaram títulos significativamente maiores de IgG anti-SGS de *P. sergenti* quando comparados com indivíduos saudáveis (Rohousova et al., 2005). Nessa perspectiva, em uma coorte prospectiva com duzentas crianças residentes em área endêmica na Tunísia foi mostrado que a presença de IgG anti-SGS de *P. papatasi* estava associada com o aumento do risco de desenvolver LC causada por *L. major* (Marzouki et al., 2011). Em adição, indivíduos naturalmente expostos a picadas de *P. papatasi* apresentaram uma frequência de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IL-10 mais elevada (Abdeladhim et al., 2011). Em Mali, área de transmissão de *L. major*, foi relatado três perfis de resposta imune celular contra a saliva de *P. duboscqi*: enquanto 23% e 25% dos indivíduos sem leishmaniose apresentam uma resposta imune do tipo Th1 ou Th2, respectivamente, 52% dos indivíduos possuem uma resposta mista Th1/Th2 (Oliveira et al., 2012). Todavia, nesse trabalho não foi possível associar o tipo de resposta imune com o desfecho clínico dos participantes.

Em uma área de transmissão de *L. braziliensis* no Brasil, pacientes com LC apresentaram maiores títulos de IgG anti-SGS de *Lu. intermedia* do que indivíduos que foram infectados pela *L. braziliensis* mas não desenvolveram a doença (De Moura et al., 2007). Essa observação e a descrição de que a pré-exposição à saliva de *Lu. intermedia* não protege o camundongo BALB/c a um desafio subsequente com *L. braziliensis* nos levaram a formular a hipótese do presente estudo: a resposta imune contra os antígenos presentes na saliva de *Lu. intermedia* influencia o desfecho da infecção por *L. braziliensis* em humanos.

## CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

### 1) DESENHO DE ESTUDO E SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS

Com a finalidade de determinar fatores relacionados com o hospedeiro e com vetor que influenciem na susceptibilidade ou na proteção à infecção por *L. braziliensis*, uma coorte prospectiva composta de familiares residentes no mesmo domicílio de pacientes com LC foi estabelecida. Com isso os critérios de inclusão adotados foram: 1) Indivíduos familiares de pacientes com LC sem diagnóstico de LC ativa ou evidência de cicatriz de LC pregressa; 2) Indivíduos com idade entre 2 e 63 anos; 3) Aceitação de participar do estudo após a leitura do termo de consentimento livre e esclarecido. Foram excluídos os indivíduos com evidência de LC ativa ou pregressa e aqueles que não concordaram em participar do estudo.

Para determinar o número de familiares de pacientes com LC que deveriam participar da coorte, um cálculo amostral foi feito baseado em estudo anterior (Castellucci et al., 2005), realizado em Corte de Pedra, área de transmissão de *L. braziliensis*, situada no sudoeste do estado da Bahia, a cerca de 300 km da cidade de Salvador. Nesse estudo, observou-se que a frequência de casos de LC ativa ou pregressa entre familiares de casos índices de leishmaniose cutânea foi de 34%. Baseando-nos na estimativa de que 10% dos indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis* desenvolverão leishmaniose e que 40% dos indivíduos sem evidência de resposta imune a antígeno de *Leishmania* desenvolverão leishmaniose, estimamos que um total de 240 indivíduos terá um poder de 80% para detectar uma diferença significativa de 0,05, assumindo 10% de perda.

Em 2010, identificamos na coorte prospectiva 68 casos índice com LC. O diagnóstico de LC foi realizado através da reação de Montenegro e a presença de lesões ulceradas típicas. A partir destes casos índice, identificamos 512 contatos familiares e, destes, 248 apresentaram doença ativa ou história pregressa e, portanto, foram excluídos do estudo. Nos 264 familiares restantes, sem LC ativa ou pregressa, os quais consentiram em participar do estudo, aplicamos um questionário abordando aspectos demográficos e epidemiológicos (Anexo 1). Em paralelo realizamos a coleta de sangue e realizamos a intradermorreação (teste de Montenegro). Dos 264 indivíduos testados, 33 (12,5%) apresentaram reação de



Montenegro positiva. A avaliação clínica no sentido de determinar o desenvolvimento de LC dos 231 indivíduos que permaneceram no estudo foi feita periodicamente. A avaliação final para determinação do desfecho foi realizada entre fevereiro e julho de 2012, ou seja, 2 anos após o início da coorte, em 2010. Adicionalmente, foi conduzido de maneira concomitante um estudo de corte transversal para análise da resposta imune celular à saliva de *Lu. intermedia*, comparando indivíduos com sorologia positiva e negativa para o SGS do mesmo vetor.

## **2) TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA PARA ANTÍGENOS DE *Leishmania***

A intradermorreação (teste de Montenegro) foi realizada utilizando antígeno solúvel de *L. braziliensis* como descrito anteriormente (Reed et al., 1986). A quantidade de 0,1 ml do antígeno foi injetada por via intradérmica no antebraço e após 48-72 horas o maior diâmetro da área de induração foi medido. A reação foi considerada positiva quando o diâmetro foi maior ou igual a 5 mm.

## **3) OBTENÇÃO DO SONICADO DE GLÂNDULA SALIVAR**

Flebótomos adultos da espécie *Lu. intermedia* foram capturados em Corte de Pedra, Bahia e foram usados para dissecação das glândulas salivares. As glândulas dissecadas foram transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL contendo geralmente 20 pares de glândulas em 20µL de HEPES 10 mM pH 7.0, NaCl 0,15 mM e mantidas a – 70° C até momento do uso. No dia dos experimentos, as glândulas foram sonicadas 20 vezes por quarenta segundos a uma frequência de dois Hertz e potência de 90 Watts através de um sonicador Branson Sonifier 450 (Branson Danbury, CT, USA). Os sonicados salivares foram centrifugados a 10.000g por 5 minutos e os sobrenadantes foram usados para realização dos experimentos.

#### **4) QUANTIFICAÇÃO DE IgG TOTAL CONTRA ANTÍGENOS DA SALIVA DE *Lu. intermedia***

Placas (Linbro/Titertek), fundo chato 96 poços foram sensibilizadas com 5 pares/mL de SGS de *Lu. intermedia*, em tampão carbonato bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$  0,45 M,  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  0,02 M, pH 9.6) e incubadas a 4°C por toda a noite. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS Tween 0,05% e bloqueadas com PBS Tween 0,05% + 1% de BSA por 2 horas a temperatura ambiente. Após bloqueio, os soros foram adicionados (diluídos 1/100) em PBS Tween 0,05% e nova incubação a 4° C foi feita por toda noite. Após novo ciclo de lavagens, as placas foram incubadas a 37°C com anti-IgG conjugado à fosfatase alcalina (Sigma, ST. Louis, MO) na diluição 1/5000 em PBS Tween 0,05% por uma hora. Seguindo outro ciclo de lavagem as reações foram reveladas com o substrato (p-nitrofenilfosfato) diluído em carbonato/bicarbonato pH 9,6 com 1mg/mL  $\text{MgCl}_2$  por 20 minutos. As reações foram interrompidas com 50 $\mu\text{L}$ /poço de NaOH 3 N e as densidades ópticas foram lidas no comprimento de onda de 405 nm em um leitor de placas Spectral Max 190 Soft Max-Pro Software versão 5 (Molecular Devices Corporation Sunnyvale, Califórnia 94089). O valor do Cut off foi estabelecido através da média dos valores de 46 controles negativos + três desvios padrão.

#### **5) QUANTIFICAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IgG (IgG1, IgG2, IgG3 E IgG4) CONTRA ANTÍGENOS DA SALIVA DE *Lu. intermedia***

As placas (Nunc-Maxisorp), fundo chato 96 poços foram sensibilizadas com 5 pares/mL de SGS de *Lu. intermedia*, em tampão carbonato bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$  0,45 M,  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  0,02 M, pH 9.6) e incubadas a 4° C por toda a noite. Após três lavagens sob agitação com PBS Tween 0,05%, as placas foram bloqueadas com PBS Tween 0,05% + 1% de BSA por duas horas a temperatura ambiente sob agitação. Os soros foram diluídos 1/100 para IgG1 e 1/10 para as subclasses IgG2, IgG3 e IgG4 em PBS Tween 0,05% + 0,25% de BSA e incubados por 2 horas a 37° C e depois pela noite toda a 4° C. Após novo ciclo de lavagem, os anticorpos anti-IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 biotinizados (Sigma) diluídos 1/1000

foram adicionados e incubados por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Concluído outro ciclo de lavagem, foi adicionado Avidina conjugada a fosfatase alcalina (Sigma) e as placas foram incubadas por 40 minutos a 37° C. As placas foram reveladas com o substrato (p-nitrofenilfosfato) diluído em carbonato/bicarbonato pH 9,6 com 1mg/mL MgCl<sub>2</sub> por 30 minutos a 37° C. As reações foram interrompidas com 50µL /poço de NaOH 3 N e as densidades ópticas foram lidas no comprimento de onda de 450 nm em um leitor de placas mencionado acima.

## **6) QUANTIFICAÇÃO DE IgE ESPECÍFICA CONTRA ANTÍGENOS DA SALIVA DE *Lu. intermedia***

Placas (Linbro/Titertek), fundo chato, 96 poços foram sensibilizadas com 5 pares/mL de SGS de *Lu. intermedia* em tampão carbonato bicarbonato (NaHCO<sub>3</sub> 0,45 M, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 0,02 M, pH 9.6) e incubadas a 4° C por toda a noite. Após um ciclo de lavagem, as placas foram bloqueadas com PBS Tween 0,05% + 5% de BSA por 1 hora a 37° C. Em seguida os soros pré-tratados com um produto contendo fator reumatoide (RF absorbent, Behring Diagnostics, Marburg, Germany) que se liga à IgG deixando livre o isotipo IgE, na diluição final de 1/4, foram adicionados e as placas foram incubadas a 4° C pela noite toda. Após 5 lavagens, as placas foram incubadas com anti-IgE conjugado à peroxidase por 2 horas a 37° C. Seguindo outro ciclo de lavagem, as reações foram reveladas com Tetrametilbenzidina por 15 minutos. As reações foram interrompidas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e as densidades ópticas foram lidas no comprimento de onda de 450 nm em um leitor de placas mencionado acima.

## **7) WESTERN BLOTS**

Cinco pares de glândulas salivares foram corridos em gel NuPAGE (8-12%) (Invitrogen) e a transferência para membrana de nitrocelulose foi feita por meio do uso do

iBlot (Invitrogen). As membranas contendo os antígenos foram bloqueados com PBS Tween 0,05% mais 5% de leite desnatado por toda noite à 4° C. Após 3 ciclos de lavagem com PBS Tween 0,05% com duração de 5 minutos cada, os soros foram adicionados na diluição 1:50 em PBS Tween 0,05% mais 5% de leite desnatado, foram colocados num volume de 600 uL por poço sobre as membranas. Os soros foram incubados durante 2 horas a 37°C. Após três lavagens, foi adicionado o segundo anticorpo (anti-IgG conjugado a fosfatase alcalina – SIGMA) na diluição de 1: 1000, durante uma hora a 37°C. Após mais uma serie de lavagens, a membrana foi revelada com o substrato para fosfatase alcalina (Western Blue - Promega).

## **8) OBTENÇÃO, ESTÍMULO E CULTURA DAS CMSP**

CMSP foram obtidas de sangue venoso periférico heparinizado, diluído 1/2 em salina e centrifugado a 1450 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente em gradiente Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O anel de CMSP foi coletado e as células foram lavadas 3 vezes com solução salina a 4° C para retirada do Ficoll residual e ressuspensas na concentração de  $3 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado com L-glutamina 2 mM, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), gentamicina (100 µg/mL) e 10% de Soro AB humano (Sigma, St. Louis, MO, USA) inativado. As células foram cultivadas em placas (Costar; Corning, NY) e estimuladas *in vitro* SGS de *Lu. intermedia* (equivalente a 1,5 par). Após 72 horas de cultura, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a – 20° C.

## **9) DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS**

As concentrações de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-13 CXCL9 e CCL2 foram determinadas no sobrenadante de CMSP após 72 horas de cultura na presença SGS de *Lu. intermedia* por meio de ELISA sanduíche, utilizando kits comerciais e seguindo as

recomendações dos fabricantes (DuoSet R&D Systems, Minneapolis, MN, USA and BD Pharmigen, San Diego, CA, USA).

## 10) CITOMETRIA DE FLUXO

As CMSP foram ressuspensas em solução salina e ajustadas para a concentração  $0,5 \times 10^6$  células/mL, colocadas em tubos de poliestireno de 5 mL. Para marcação intracelular as células foram mantidas em cultura por 24 horas na presença ou não do SGS (equivalente a 1,5 par), sendo 4 horas na presença de Brefeldina A. Na marcação de superfície celular foram utilizados os anticorpos CD4, CD8 e CD25 (e-Bioscience) e as células foram mantidas a 4° C, na ausência de luz por 20 minutos. Em seguida, as CMSP foram lavadas com solução salina (0,9% NaCl) e fixadas com paraformoldeído a 2%. Após marcação com anticorpos de superfície, as CMSP foram lavadas com solução salina (0,9% NaCl) e ressuspensas em BD Perm/Wash 1x por 15 minutos, para marcação intracelular. Após outra lavagem, as células foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-IL-10 e anti-FOXP3 por 30 minutos e protegidas da luz a 4°C. Em seguida, as CMSP foram lavadas com BD Perm/Wash 1x e ressuspensas em solução salina (0,9% de NaCl). Imediatamente após a marcação intracelular foram realizadas as leituras destas células utilizando o FACS Canto II.

## 11) PCR EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DE GENES INDUZIDOS POR IFN

Após a estimulação com SGS de *Lu. Intermedia* por 72 horas, o RNA total das CMSP foi isolado empregando-se Trizol® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Cerca de um µg de RNA total foi utilizado para a síntese do cDNA (ImProm-II, Promega), conforme instruções do fabricante. O cDNA foi amplificado utilizando o SYBR Green (Applied Biosystems) no aparelho ABI 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, utilizando o reagente “SYBR-Green PCR Master MIX” (Applied Biosystems) e o equipamento “Perkin-Elmer ABI Prism 7500 Sequence Detection System”. A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual do fabricante ABI PRISM 7500. Cada amostra e controle negativo foram amplificados em triplicata, empregando iniciadores específicos (Weinkopff et al., submetido). O método comparativo foi utilizado para determinação da expressão gênica (Livak e Schmittgen et al., 2001), sendo os níveis de expressão dos genes de interesse normalizados conforme o gene endógeno HPRT. Os valores foram obtidos utilizando o cálculo do  $\Delta\Delta Ct$  onde  $\Delta Ct = Ct$  (gene alvo) –  $Ct$  (HPRT gene). O aumento ou diminuição na expressão gênica em CMSP estimuladas com saliva foi determinado por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (alvo) –  $\Delta Ct$  (controle). Os resultados foram expressos no número de vezes em que os níveis de expressão gênica das CMSP de indivíduos expostos a saliva foram maiores em relação a expressão nas células de indivíduos não expostos (controles).

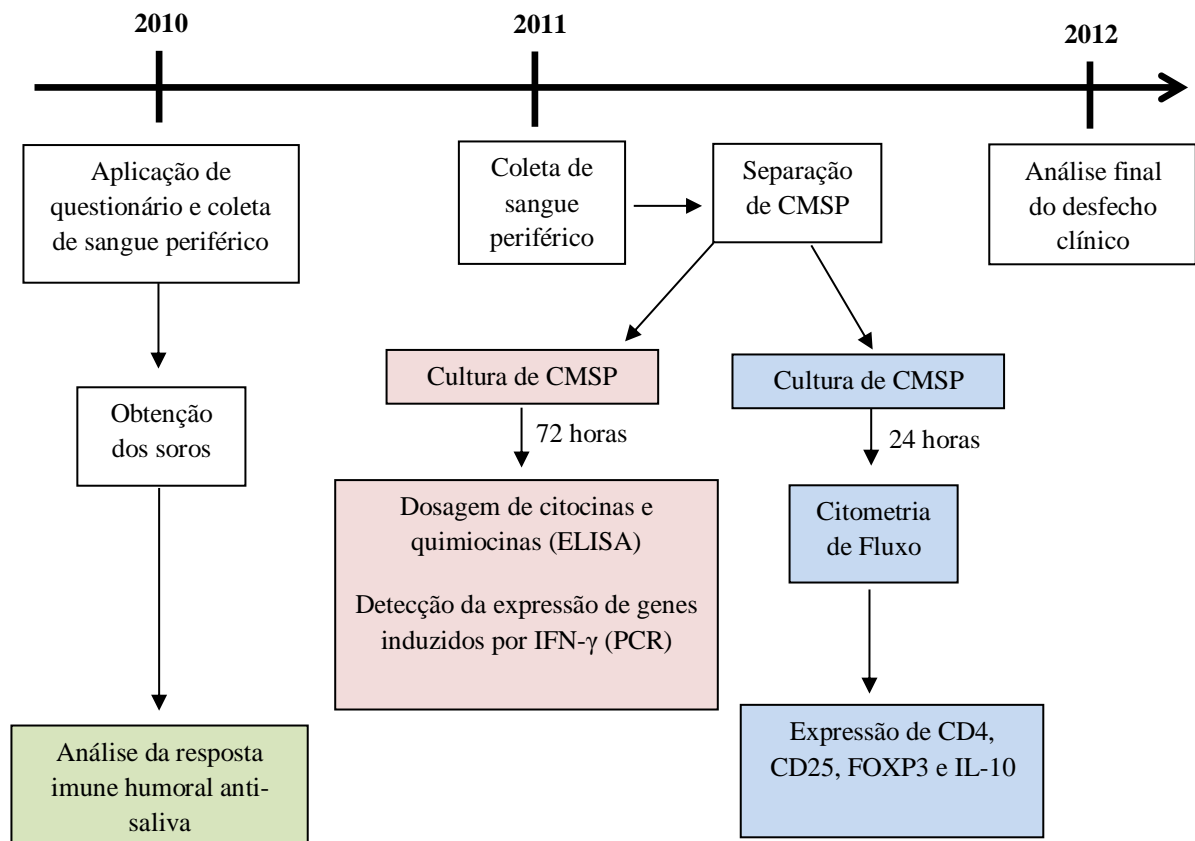
## **12) ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para análise estatística foram usados testes não paramétricos. A análise estatística foi feita pelo teste Mann Whitney para comparação entre duas medias e Kruskal-wallis (comparação entre três ou mais medias). Variáveis em diferentes condições no mesmo indivíduo foram analisadas pelo teste de Wilcoxon. O teste exato de Fisher foi utilizado para as variáveis categóricas e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. O cálculo do risco relativo foi realizado através da incidência de LC nos indivíduos expostos (sorologia positiva para saliva) sobre a incidência de LC nos indivíduos não expostos (sorologia negativa).

### **13) ASPÉCTOS ÉTICOS**

O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (parecer No: 240/2009) (Anexo 3) e todos pacientes ou familiares responsáveis pelos menores assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

## 14) DESENHO EXPERIMENTAL

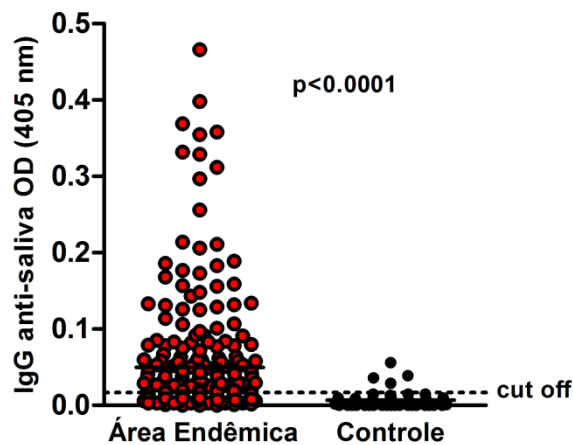




## RESULTADOS GERAIS

### 1) IgG ANTI-SALIVA EM INDIVÍDUOS RESIDENTES EM ÁREA ENDÊMICA E EM CONTROLES

Inicialmente, os títulos de IgG total contra antígenos da saliva de *Lu. intermedia* presentes no soro de indivíduos de área endêmica para *L. braziliensis* e de controles de área não endêmica foram determinados através de ensaio de ELISA indireto. Cento e cinquenta (56,8%) indivíduos de Corte de Pedra apresentaram sorologia positiva enquanto quatro (8,6%) indivíduos controle, de área não endêmica, também apresentaram sorologia positiva ( $p < 0,001$ ) (Figura 1). Em relação ao número de indivíduos com sorologia positiva por residência, em dez casas (14,7%) nenhum contato familiar apresentou sorologia positiva para SGS de *Lu. intermedia*, em 16 residências (23,5%) havia somente um morador com anticorpos anti-SGS, enquanto em 42 domicílios (61,7%) dois ou mais moradores apresentaram sorologia positiva.



**Figura 1. Resposta humoral anti-saliva de *Lu. intermedia* de indivíduos naturalmente expostos à *Lu. intermedia*.** O ELISA foi realizado empregando-se SGS de *Lu. intermedia* e os soros de indivíduos de área endêmica ( $n = 264$ ) e de controles de área não endêmica ( $n = 46$ ). O valor do *cut off* foi estabelecido através da média dos valores de 46 controles negativos + três desvios padrão. Os valores estão mostrados individualmente e as barras horizontais representam as medianas.

## 2) DADOS DEMOGRÁFICOS E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Com objetivo de entender melhor a dinâmica de exposição à picada de *Lu. intermedia*, dados epidemiológicos e demográficos de indivíduos com sorologia positiva ou negativa para SGS de *Lu. intermedia* são apresentados na Tabela 2. Nos 264 indivíduos participantes e residentes em área de exposição à *Lu. intermedia*, a idade variou entre 2 a 63 anos (mediana de 14 anos), sendo destes 122 homens (46,2%) e 142 mulheres (53,7%). Não houve diferença significativa entre os indivíduos com sorologia positiva e indivíduos com sorologia negativa com relação às variáveis idade, gênero, ocupação, tempo na área endêmica e tempo na mesma casa. Por outro lado, encontramos uma associação entre a sorologia positiva e o retorno a casa após as 16 horas.

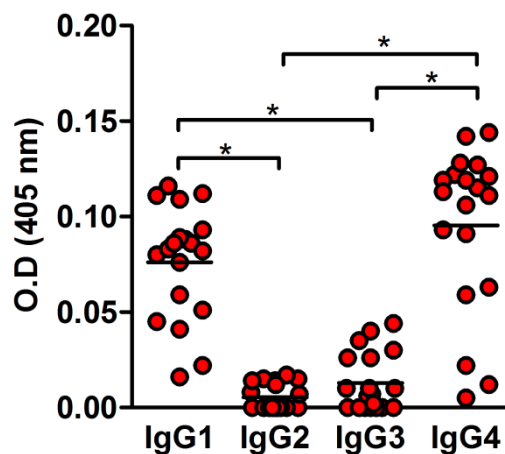
**Tabela 2. Dados demográficos e epidemiológicos de indivíduos residentes em área endêmica, expostos ou não a saliva de *Lu. intermedia*.**

Variáveis	Sorologia positiva para SGS (n=150)	Sorologia negativa para SGS (n=114)	Valor de p
<b>Idade (anos)</b>	14 (2 – 53)	15 (2 – 63)	0.15
<b>Gênero (%masc.)</b>	74 (49,3)	48 (42,1)	0.2
<b>Ocupação, N (%)</b>			
Agricultor	21 (14)	23 (20,1)	0.2
Doméstica	35 (23,3)	30 (26,3)	
Estudante/Outros	94 (62,6)	61 (53,5)	
<b>Anos na área endêmica</b>	14 (2 – 53)	14,5 (2 – 63)	0.18
<b>Anos na mesma casa</b>	9 (0 – 53)	9 (0 – 56)	0.6
<b>Chegada em casa após as 16h, N (%)</b>	38 (25,3)	15 (13,1)	0.01

Nota: As variáveis contínuas são representadas por mediana (variação)

### 3) SUBCLASSES DE IgG ANTI-SGS EM INDIVÍDUOS RESIDENTES EM ÁREA ENDÊMICA E EXPOSTOS A SALIVA

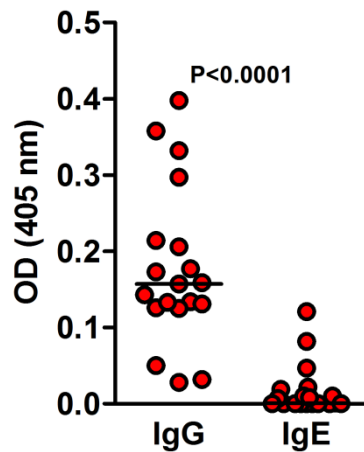
Em seguida, determinamos as subclasses de IgG específicas para a saliva de *Lu. intermedia* nos indivíduos com sorologia positiva. Esses experimentos foram realizados em um corte transversal da amostra original. Assim, selecionamos 19 indivíduos que apresentaram sorologia positiva para a saliva de *Lu. intermedia* (D.O. média  $0,177 \pm 0,10$ ). Como mostrado na Figura 2, a subclasse IgG1 predominou quando comparada às subclasses IgG2 ( $p < 0,0001$ ) e IgG3 ( $p < 0,0001$ ). Em adição, a subclasse IgG4 foi encontrada em maiores títulos do que as subclasses IgG2 ( $p < 0,0001$ ) e IgG3 ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferença significativa entre IgG1 e IgG4 (Figura 2). Também observamos uma correlação positiva entre as densidades ópticas de IgG total anti-SGS e as subclasses IgG1 ( $p = 0,009$ ;  $r = 0,5$ ) e IgG4 ( $p = 0,004$ ;  $r = 0,6$ ) (dados não mostrados).



**Figura 2.** Subclasses de IgG anti-saliva em indivíduos naturalmente expostos a *Lu. intermedia*. O ELISA foi realizado empregando-se SGS de *Lu. intermedia* e soros de indivíduos de área endêmica positivos para *Lu. intermedia* (n=19). Os valores estão mostrados individualmente e as barras horizontais representam as medianas, \* $p < 0,05$ .

#### 4) IgE ANTI-SALIVA EM INDIVÍDUOS RESIDENTES EM ÁREA ENDÊMICA

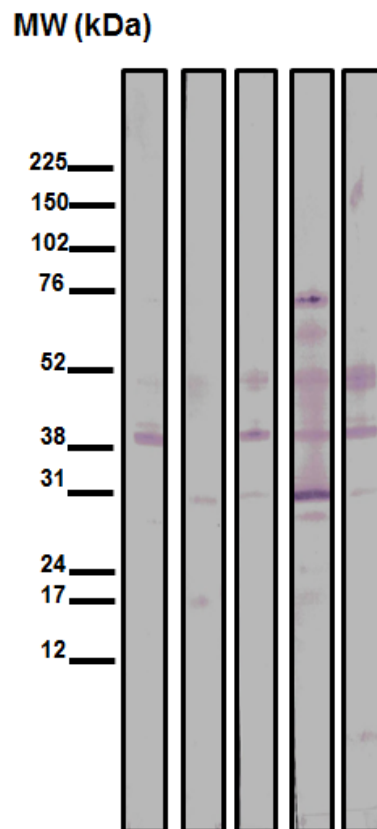
Em seguida, também avaliamos os títulos de IgE anti-saliva de *Lu. intermedia* nos mesmos 19 indivíduos testados anteriormente (Figura 2). Indivíduos expostos a *Lu. intermedia* possuem maiores concentrações de IgG do que IgE anti-SGS de *Lu. intermedia* (Figura 3). Ademais, não houve correlação entre IgE e o IgG total ou entre IgE e as subclasses de IgG (dados não mostrados).



**Figura 3.** IgE anti-saliva em indivíduos naturalmente expostos a *Lu. intermedia*. O ELISA foi realizado empregando-se SGS de *Lu. intermedia* e soros de indivíduos de área endêmica positivos para *Lu. intermedia* (n=19). Os resultados estão mostrados individualmente e as barras horizontais representam as medianas.

## 5) RECONHECIMENTO DAS PROTEÍNAS DA SALIVA DE *Lu. intermedia* POR SOROS DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS

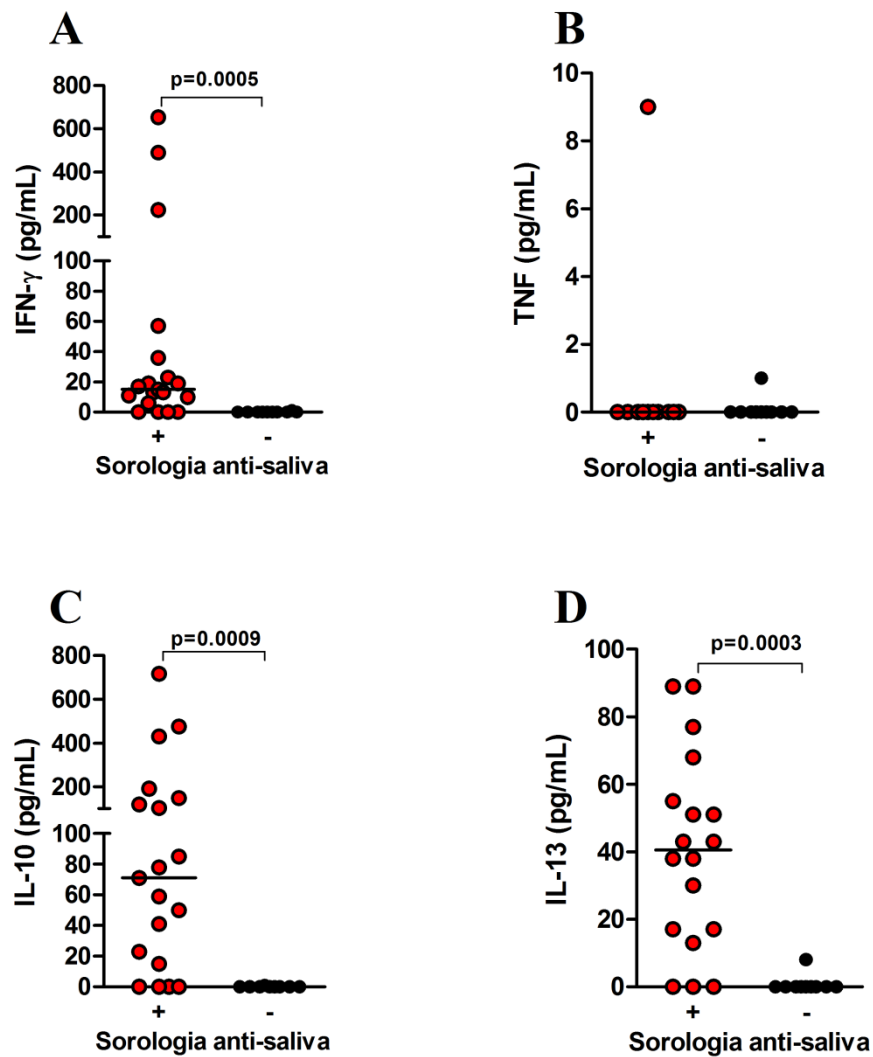
Western blots foram realizados com os soros de indivíduos naturalmente expostos à saliva de *Lu. intermedia*. Soros de indivíduos com sorologia positiva reconhecem preferencialmente as proteínas de 17, 31, 38, 52, 76 kDa.



**Figura 4. Detecção de proteínas presentes na saliva de *Lu. intermedia* por Western blot, em indivíduos naturalmente expostos.** Soros de indivíduos naturalmente expostos à *Lu. intermedia* (n = 5) foram avaliados por Western blot contra SGS de *Lu. intermedia*.

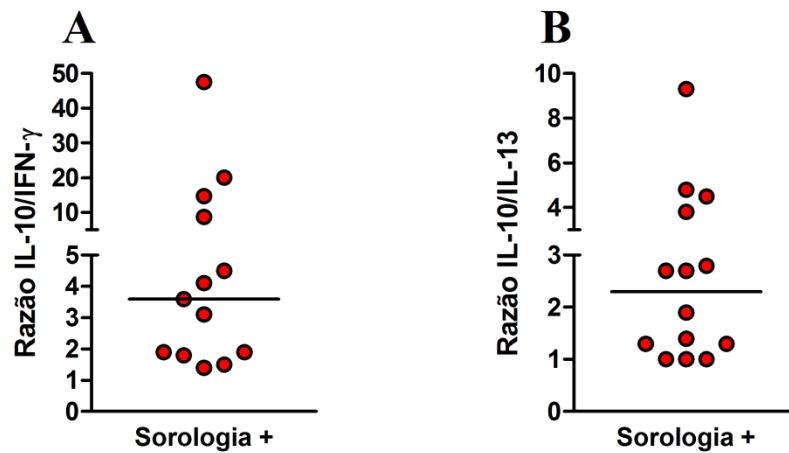
## 6) PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRODUZIDAS POR INDIVÍDUOS RESIDENTES EM ÁREA ENDÊMICA

Após a avaliação da resposta imune humoral, partimos para o estudo da resposta imune celular dos indivíduos expostos à saliva de *Lu. intermedia*. Novamente, para esses experimentos, selecionamos 19 indivíduos com sorologia positiva para a saliva de *Lu. intermedia* (média da D.O.  $0,177 \pm 0,10$ ). Como controles, empregamos dez indivíduos também residentes da área endêmica com sorologia anti-SGS de *Lu. intermedia* negativa. As concentrações de citocinas e quimiocinas foram determinadas no sobrenadante de CMSP após cultivo das mesmas por 72 horas na presença de SGS. Indivíduos com resposta humoral anti-saliva produziram concentrações significativamente maiores de IFN- $\gamma$  (15 pg/mL, variando de 0 a 653 pg/mL) do que indivíduos com sorologia negativa (0 pg/mL, variando de 0 a 1 pg/mL) (Figura 5A). Não houve diferença na produção de TNF entre indivíduos expostos a *Lu. intermedia* e indivíduos controle ( $p=0.94$ ). De fato, em apenas um indivíduo com sorologia positiva detectamos produção de TNF (Figura 5B). Por outro lado, indivíduos com sorologia positiva para saliva produziram altas concentrações de IL-10 (71 pg/mL, variando de 0 a 716 pg/mL quando comparadas com indivíduos com sorologia negativa (0 pg/mL, variando de 0 a 2 pg/mL) (Figura 5C). O mesmo ocorreu com a produção de IL-13, indivíduos expostos à saliva de *Lu. intermedia* também produzem concentrações significativamente maiores desta citocina (Figura 5D).



**Figura 5.** Concentração de citocinas no sobrenadante de culturas de células de indivíduos com sorologia positiva e negativa para SGS de *Lu. intermedia*. CMSP de indivíduos com sorologia positiva anti-SGS (n=19) ou com sorologia negativa (n=10) foram cultivadas na presença de SGS por 72 horas e as concentrações das citocinas foram determinadas por ELISA. Concentrações de IFN- $\gamma$  (A), TNF (B), IL-10 (C) e IL-13 (D). Os valores estão apresentados individualmente e as barras horizontais representam as medianas.

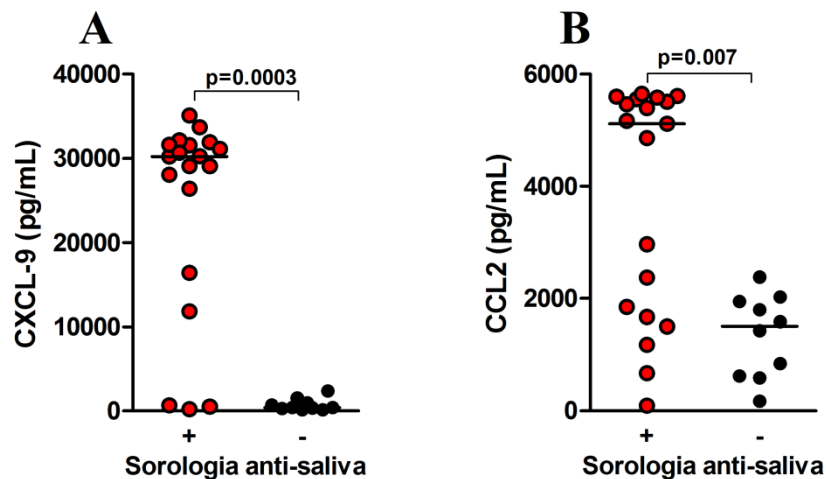
Embora tenhamos observado que indivíduos com sorologia positiva para a saliva de *Lu. intermedia* tenham uma resposta imune celular mista com a presença de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-13, houve predomínio na produção de IL-10 quando comparado com a produção de IFN- $\gamma$  e de IL-13 (Figuras 6A e 6B). Adicionalmente, não foi encontrada nenhuma correlação entre as concentrações das citocinas e os títulos de IgG anti-SGS (dados não mostrados).



**Figura 6. Razão da produção de citocinas no sobrenadante de culturas de células de indivíduos com sorologia positiva para SGS de *Lu. intermedia*.** CMSP de indivíduos com sorologia positiva anti-SGS (n=19) foram cultivadas na presença do SGS por 72 horas e as concentrações das citocinas foram mensuradas por ELISA. Os valores das razões de IL-10/IFN- $\gamma$  (A) e IL-10/IL-13 (B) estão apresentados individualmente e as barras horizontais representam as medianas.

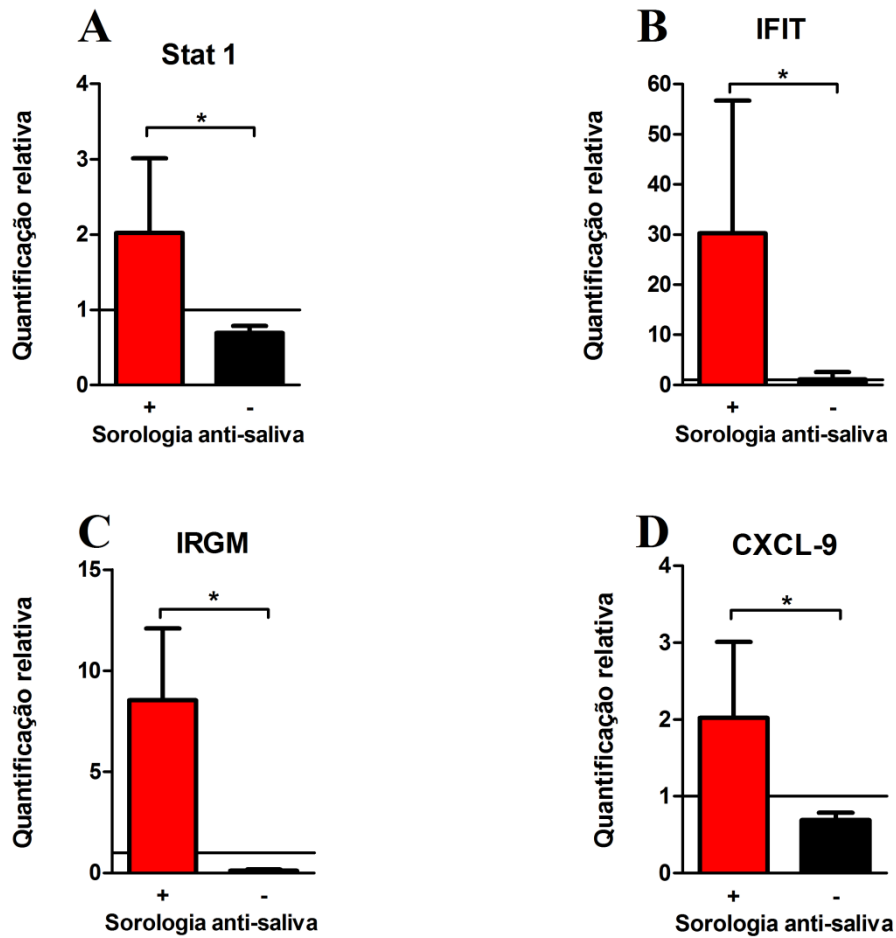
Em relação à produção de quimiocinas, indivíduos com sorologia positiva apresentaram produção mais elevada de CXCL9 (30.207 pg/mL, variando de 217 a 35.089 pg/mL) do que indivíduos com sorologia negativa (421 pg/mL, variando de 149 a 2.397 pg/mL) (Figura 7A). Não foi encontrada correlação entre CXCL9 e IFN- $\gamma$  (dados não mostrados). A produção de CCL2 também foi significativamente maior nos indivíduos com sorologia positiva (5.116 pg/mL, variando de 93 a 5.649 pg/mL) quando comparado com os indivíduos com sorologia negativa (1.508 pg/mL, variando de 172 a 2.384 pg/mL) (Figura 7B). Não houve correlação entre as concentrações das quimiocinas e os títulos de IgG anti-SGS (dados não mostrados).





**Figura 7. Concentração de quimiocinas no sobrenadante de culturas de células de indivíduos com sorologia positiva e negativa para SGS de *Lu. intermedia*.** CMSP de indivíduos com sorologia positiva anti-SGS (n=19) ou com sorologia negativa (n=10) foram cultivadas na presença de SGS por 72 horas e as concentrações de CXCL9 (A) e CCL2 (B) foram mensuradas por ELISA. Os valores estão apresentados individualmente e as barras horizontais representam as medianas.

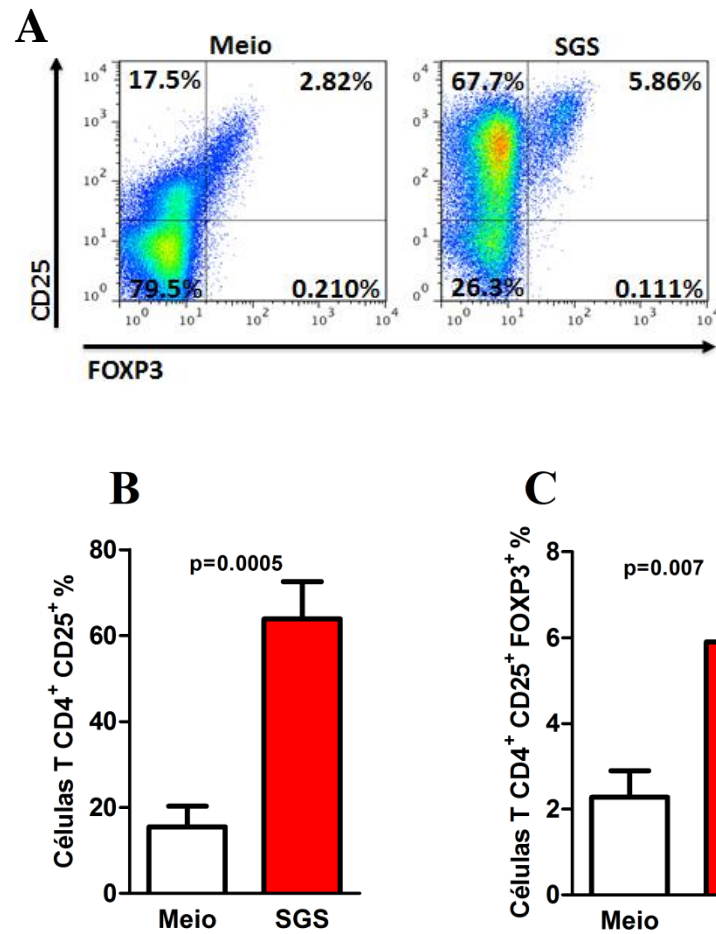
Devido à observação de que CMSP de indivíduos com sorologia positiva para a saliva de *Lu. intermedia* secretam IFN- $\gamma$  e CXCL9 quando estimuladas com SGS, verificamos se a saliva de *Lu. intermedia* modula a expressão de alguns genes induzidos por IFN. Para tal, CMSP de indivíduos com sorologia positiva anti-SGS (n=7) e de indivíduos com sorologia negativa (n=6) foram estimuladas com SGS por 72 horas e o RNA total foi extraído para avaliação da expressão gênica. De fato, indivíduos expostos naturalmente à saliva de *Lu. intermedia* apresentaram uma expressão significativamente mais elevada dos genes induzidos por IFN: STAT1, IFIT, IRGM e CXCL9 (Figura 8A, 8B, 8C e 8D, respectivamente) do que controles não expostos. O resultado de expressão mais elevada de CXCL9 confirma o achado referente à detecção da proteína no sobrenadante de cultura (Figura 7A).



**Figura 8. Expressão de genes induzidos por IFN em indivíduos com sorologia positiva e negativa para SGS de *Lu. intermedia*.** CMSP de indivíduos com sorologia positiva anti-SGS (n=7) ou com sorologia negativa (n=6) foram cultivadas na presença de SGS por 72 horas e o RNA foi submetido a ensaios de PCR em tempo real para a determinação da expressão de STAT1 (A), IFIT (B), IRGM (C) e CXCL9 (D). \*p<0.05.

## 7) ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS T CD4<sup>+</sup>, (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) e (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>)

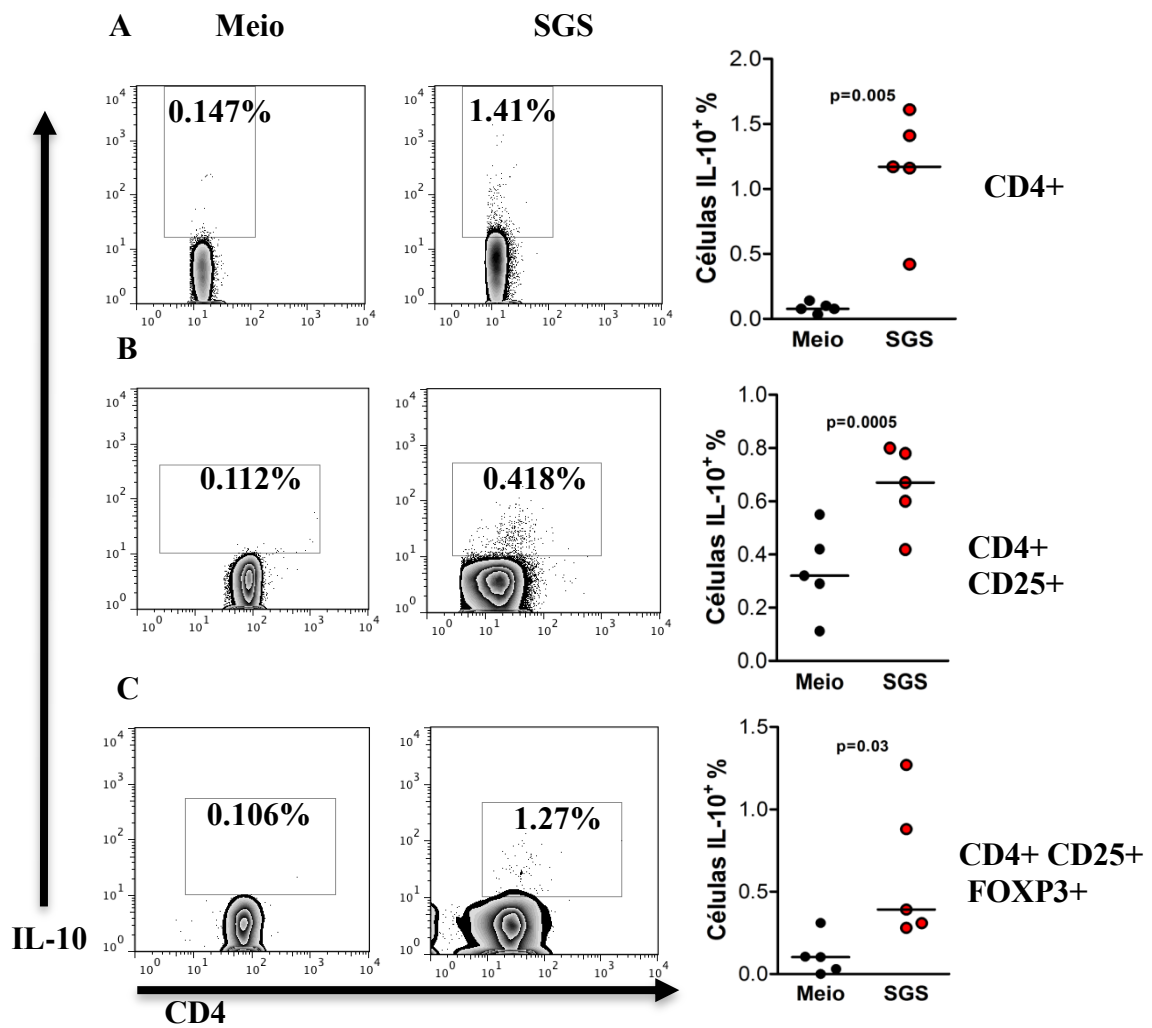
Uma vez que detectamos uma produção de IL-10 associada aos indivíduos com sorologia positiva para a saliva de *Lu. intermedia*, fomos avaliar se esta produção estava associada com células T reguladoras. A frequência das subpopulações de célula T CD4<sup>+</sup> (CD25<sup>+</sup>) e (CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) foram determinadas por citometria de fluxo em cinco indivíduos com sorologia positiva para SGS (média da D.O.= 0,197 ± 0,09). Como mostrado na Figura 9, à estimulação *in vitro* de CMSP com SGS de *Lu. intermedia* induziu um aumento da frequência das células T CD4<sup>+</sup> expressando CD25<sup>+</sup> (p=0,005) e FOXP3<sup>+</sup> (p=0,007) (Figura 9A, 9B e 9C).



**Figura 9.** Frequência das subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> (CD25<sup>+</sup>) e (CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) em indivíduos com sorologia positiva para SGS de *Lu. intermedia*. CMSP de indivíduos com sorologia positiva anti-SGS (n=5) foram cultivadas na presença ou ausência de SGS de *Lu. intermedia*. (A) *Dot plot* representativo mostrando a frequência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. (B) e (C) Frequência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, respectivamente em cinco indivíduos. Os dados estão mostrados como média e desvio padrão e são representativos de um experimento.

## **8) ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS T CD4<sup>+</sup>, (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) e (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) POSITIVAS PARA IL-10**

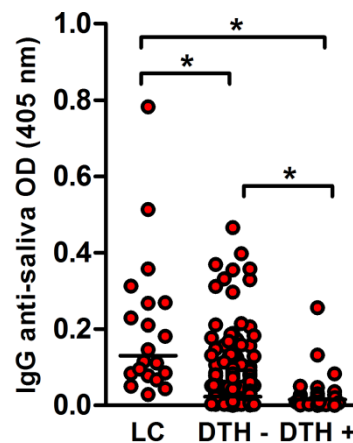
Em seguida, avaliamos se as células T CD4<sup>+</sup> e, subsequentemente, se as subpopulações (CD25<sup>+</sup>) e (CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) estavam associadas com a produção de IL-10. Esses ensaios foram realizados com os mesmos cinco indivíduos anteriores (Figura 9). Após a estimulação de CMSP com SGS, houve um aumento significativo na porcentagem de células T CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> (p=0,005) (Figura 10 A). O mesmo ocorreu com as subpopulações CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (p=0,0005) e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (p=0,03) (Figura 10B e 10C, respectivamente). Adicionalmente, não houve diferença na frequência de células T CD8<sup>+</sup> expressando IL-10 após estímulo com SGS (dados não mostrados).



**Figura 10.** Frequências de células T CD4<sup>+</sup> e das suas subpopulações (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) e (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) positivas para IL-10. CMSP de indivíduos com sorologia positiva para SGS de *Lu. intermedia* (n=5) foram cultivadas na presença ou ausência de SGS de *Lu intermedia*. (A) *Dot Plot* e frequência de células CD4<sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup>, (B) *Dot Plot* e frequência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup>, (C) *Dot Plot* e frequência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup>. Os dados estão mostrados como média  $\pm$  desvio padrão e são representativos de um experimento.

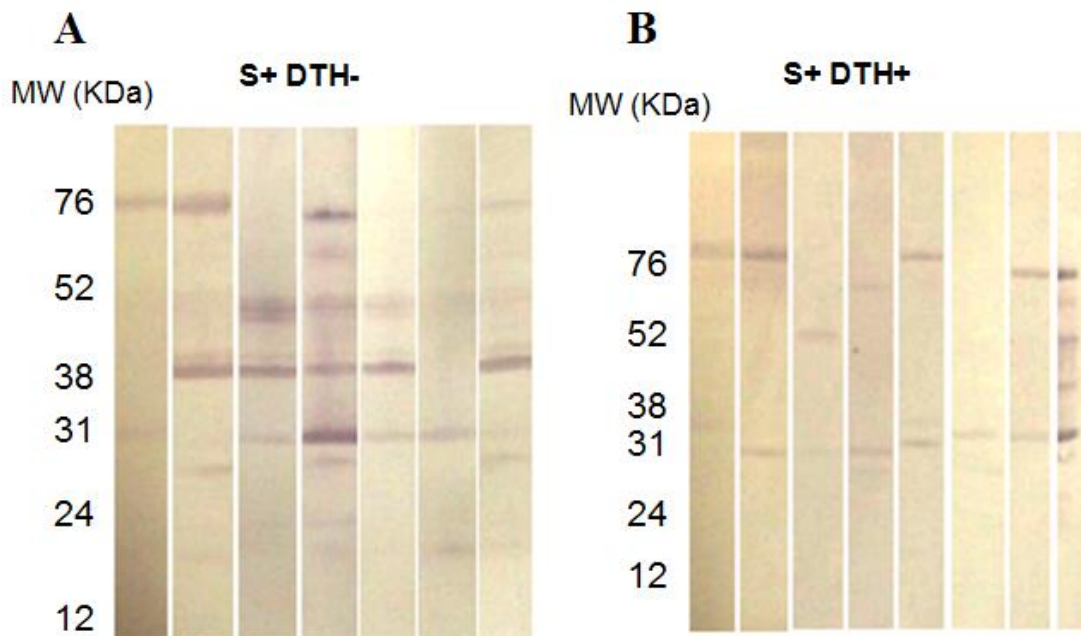
## 9) COMPARAÇÃO ENTRE RESPOSTA IMUNE HUMORAL CONTRA ANTÍGENOS DA SALIVA DE *Lu. intermedia* E RESPOSTA IMUNE CELULAR A *Leishmania* (DTH)

Uma vez que detectamos uma resposta com características reguladoras, com presença de células  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  e produção de IL-10, fomos avaliar se havia diferença na resposta imune humoral à saliva de *Lu. intermedia* em indivíduos com e sem resposta celular à *Leishmania*. Como marcador de resposta imune celular à *Leishmania*, utilizamos a intradermorreação (reção de Montenegro). Nesses ensaios, observamos que pacientes com LC ativa possuem uma resposta humoral anti-SGS significativamente mais elevada do que indivíduos com intradermorreação negativa (DTH-) ou com intradermorreação positiva (DTH+) para antígenos de *Leishmania* (Figura 11). Adicionalmente, indivíduos da área endêmica com DTH negativo também apresentam resposta humoral significativamente maior do que indivíduos DTH positivo e não foi encontrada nenhuma correlação entre anticorpos anti-SGS e o DTH para *Leishmania* (dado não mostrado) (Figura 11).



**Figura 11. IgG anti-saliva em indivíduos com LC ativa, e com ou não resposta imune celular à *Leishmania*.** ELISA foi realizado empregando-se SGS de *Lu. intermedia* e os soros de indivíduos com LC ativa (n=20) ou os soros de indivíduos sem resposta imune celular à *Leishmania* (DTH-) (n=231) ou com resposta imune celular à *Leishmania* (DTH+) (n=33). Os valores estão mostrados individualmente e as barras horizontais representam as medianas, \*p<0.05.

Em seguida, comparamos o perfil de proteínas reconhecidas por soros de indivíduos positivos para sorologia anti-SGS de *Lu. intermedia* e portadores ou não de resposta celular à *Leishmania* (DTH+ vs DTH-, respectivamente). Como mostrado na Figura 12, soros de indivíduos com DTH- apresentaram uma forte resposta contra as proteínas da saliva de *Lu. intermedia* quando comparados com indivíduos caracterizados como DTH+. Enquanto soros de sujeitos com DTH – reconhecem preferencialmente as proteínas de 31, 38, 52 e 76 kDa, soros de indivíduos com DTH + reconhecem de maneira preferencial somente as proteínas de 31 e 76 kDa. Adicionalmente, as proteínas de 31 e 76 kDa são as mais reconhecidas por soros de ambos os grupos.



**Figura 12. Detecção de proteínas presentes na saliva de *Lu. intermedia* por Western blot em indivíduos portadores ou não de resposta celular anti-*Leishmania*.** Soros de indivíduos caracterizados como sorologia positiva anti-*Lu. intermedia* e sem resposta imune celular à *Leishmania* (Sorologia+DTH-) (n=7) (A) e soros de indivíduos caracterizados como sorologia positiva anti-*Lu. intermedia* e com resposta imune celular à *Leishmania* (Sorologia+DTH+) (n=8) (B) foram avaliados por Western blot contra SGS de *Lu. intermedia*.



## 10) ANÁLISE DO RISCO RELATIVO DE DESENVOLVER LC

Devido à documentação de que a positividade do DTH para *Leishmania* confere uma proteção parcial contra o desenvolvimento da doença (Salah et al., 2005), analisamos, por fim, o risco relativo de desenvolvimento de LC em 231 indivíduos com intradermorreação negativa (DTH-) no início do estudo (2010). Dos 231 indivíduos acompanhados durante 2 anos do estudo (2010 a 2012), 23 (9,9%) desenvolveram LC e, desses 23 indivíduos, 14 (60,8%) possuíam sorologia positiva para SGS de *Lu. intermedia*. Assim, encontramos que o risco de desenvolver LC é 11% mais elevado nos indivíduos naturalmente expostos a saliva de *Lu. intermedia*.

## DISCUSSÃO

Doenças causadas por vetores geram um sério problema de saúde pública em diversas regiões do mundo. No caso da Leishmaniose, o fato de não existir uma vacina eficaz fez com que estratégias de prevenção tais como o controle dos vetores, reservatórios e proteção individual venham sendo adotadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011). Nesse contexto, o entendimento da epidemiologia da doença, assim como o monitoramento da população de flebotomíneos são cruciais para implementação de medidas de controle eficientes. Em paralelo, vem crescendo a utilização da avaliação da resposta imune contra o SGS de flebotomíneos como forma de monitoramento da densidade populacional do vetor em diversas áreas endêmicas (Rohousova et al., 2005; Clements et al., 2010; Texeira et al., 2010; Souza et al., 2010; Marzouki et al., 2011). Dando suporte a este fato, foi documentada uma correlação positiva entre anticorpos anti-SGS de *P. argentipes* e a densidade do vetor na Índia (Clements et al., 2010). Adicionalmente, a documentação de que fatores relacionados com a saliva do vetor, junto com o parasita e o hospedeiro podem influenciar o desfecho clínico da infecção, também aumentou o interesse da comunidade científica a respeito estudo da imunidade à saliva de flebótomos.

No presente trabalho mostramos que indivíduos residentes de Corte de Pedra apresentam maiores títulos de IgG anti-SGS de *Lu. intermedia* do que indivíduos controles de área não endêmica. O mesmo achado foi documentado com soros de residentes de outra área de transmissão de *L. braziliensis* (De Moura et al., 2007). De maneira semelhante, foi descrito maior resposta humoral contra a saliva de *P. papatasi* e de *P. sergenti*, em moradores de uma área de transmissão de *L. tropica*, na Turquia, quando comparados com residentes de área não endêmica na República Tcheca (Rohousova et al., 2005). Adicionalmente, habitantes de uma área endêmica de LV na Índia apresentam maiores concentrações de anticorpos anti-SGS de *P. argentipes* do que indivíduos de área não endêmica (Clements et al., 2010). Esses resultados podem refletir uma maior exposição a picadas do vetor em moradores de área endêmica. No trabalho atual observamos que a presença de sorologia positiva para o SGS de *Lu. intermedia* foi associada com o retorno dos indivíduos para as residências após as 16 horas. É sabido que os flebótomos possuem hábitos crepuscular e noturno, o aumento da população do vetor a partir deste horário pode então favorecer uma maior exposição a picadas. Nesse contexto, alguns trabalhos relatam que a permanência fora de casa durante esse

período constitui um fator de risco para o desenvolvimento da Leishmaniose (Caldas et al., 2002; Moreno et al., 2005).

Além disso, encontramos que pacientes com LC ativa apresentavam uma maior resposta humoral anti-saliva do que indivíduos com DTH negativo ou positivo para antígenos do parasita. Em 2007 nosso grupo mostrou em outra área endêmica resultado semelhante (Moura et al., 2007). Corroborando com nossos dados, na Turquia, indivíduos com lesões ativas de LC tiveram maior resposta humoral à saliva de *P. sergenti* do que indivíduos sadios (Rohousova et al., 2005). De maneira mais evidente, um estudo de coorte na Tunísia mostrou que indivíduos que desenvolveram LC causada por *L. major* possuíam níveis mais elevados de IgG anti-SGS de *P. papatasi* do que aqueles que não desenvolveram a enfermidade durante o seguimento (Marzouki et al., 2011). Juntos, esses achados indicam que a resposta humoral a diversas espécies de flebotômíneos pode ser um marcador de risco para o desenvolvimento de LC. Adicionalmente vimos que indivíduos com DTH negativo para *Leishmania* possuem maiores títulos de IgG anti-SGS de *Lu. intermedia* do que indivíduos com DTH positivo para *Leishmania* e também não observamos uma correlação entre a resposta humoral anti-saliva e a resposta de DTH para *Leishmania*. Esses resultados diferem dos encontrados em estudos realizados em área endêmica de LV, nos quais observou-se uma associação entre a presença de anticorpos anti-saliva de *Lu. longipalpis* e DTH positivo para *L. infantum-chagasi* (Barral et al., 2000; Gomes et al., 2002; Aquino et al., 2010). Assim, vemos que a resposta à saliva de *Lu. intermedia* é diferente da resposta imune contra antígenos da saliva de *Lu. longipalpis*. Outro achado do nosso estudo foi que o soro de indivíduos com DTH negativo para *Leishmania* reconhecem uma maior variedade de proteínas de *Lu. intermedia* do que soros de indivíduos caracterizados como DTH positivo. Esse resultado acompanha e pode ser reflexo dos altos títulos de IgG anti-SGS encontrados nos indivíduos caracterizados como DTH negativo.

As principais subclasses de IgG encontradas em indivíduos de área de transmissão de *L. braziliensis* foram IgG1 e IgG4. Um resultado semelhante foi descrito em indivíduos experimentalmente expostos à picadas de *Lu. longipalpis* (Vinhas et al., 2007). Além disso, observamos uma correlação positiva entre IgG total anti-SGS e as subclasses IgG1 e IgG4, indicando que essas duas subclasses podem ser usadas como alvo de ensaios sorológicos em área endêmica. A presença de IgE anti-saliva foi associada com reações alérgicas à picada de mosquito (Peng et al., 2004). Aqui, observamos, na população estudada, uma predominância de IgG anti-SGS em relação a IgE específica anti-saliva, constatado pela alta razão IgG/IgE

(dado não mostrado). Da mesma maneira, foi documentado que indivíduos que desenvolvem DTH para antígenos da saliva de *Lu. longipalpis* apresentam alta razão IgG/IgE comparados com aqueles que exibiram uma reação de hipersensibilidade imediata (Vinhas et al., 2007). Em relação à resposta humoral anti-saliva, mostramos que soros de indivíduos residentes em área endêmica de LT reconhecem preferencialmente as proteínas de 31, 38, 52, 76 kDa da saliva de *Lu. intermedia*, sendo as proteínas de 31 e 76 kDa as mais imunogênicas. De maneira similar, as proteínas de 31, 52 e 76 kDa foram reconhecidos também por soros de indivíduos residentes em outra área de transmissão de *L. braziliensis* (De Moura et al., 2007).

Com relação à resposta imune celular, encontramos que CMSP de indivíduos com sorologia positiva para a saliva *Lu. intermedia* produzem IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-13 quando estimuladas com SGS. Resposta mista, com a presença de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 também foi encontrada em camundongos BALB/c imunizados com a saliva do mesmo vetor (de Moura et al., 2007). Como a saliva de flebótomos possui diversas proteínas (Valenzuela et al., 2001, De Moura et al., 2013), é possível que diferentes componentes proteicos induzam perfis distintos de resposta imune anti-saliva. De fato, em uma área de transmissão de *L. major*, foi documentada a produção de citocinas do tipo Th1 e Th2 por CMSP de indivíduos expostos à saliva de *P. duboscqi* (Oliveira et al., 2012). Em indivíduos experimentalmente expostos à *Lu. longipalpis* também foi observada a produção concomitante de IFN- $\gamma$  e de IL-10 (Vinhas et al., 2007). Em nosso estudo, apesar da documentação de uma resposta imune mista, encontramos um predomínio da produção de IL-10, principal citocina também relatada em indivíduos expostos à saliva de *P. papatasi* na Tunísia (Abdeladhim et al., 2011). É sabido que a saliva de *Lu. intermedia* possui adenosina (De Moura et al., 2013), proteína capaz de induzir a produção de IL-10 e capaz de suprimir a produção de TNF e IL-12 (Hasko et al., 1996; Hasko et al., 2000). Sendo assim, é possível que a adenosina esteja influenciando a produção de IL-10 nesses indivíduos.

A presença da IL-10 vem sendo associada com a patologia da LV humana (Ghalib et al., 1993; Carvalho et al., 1994; Ismail et al., 1999). Além disso, em modelos experimentais de LC foi mostrado que a IL-10 favorece a proliferação da *Leishmania* e, na ausência dessa citocina, o camundongo atinge uma cura estéril, com erradicação do parasita (Kane et al., 2001; Belkaid et al., 2001). Recentemente, foi documentado que a IL-10 possui um papel crucial no desenvolvimento da LC e que, nesses pacientes, a IL-10 é produzida principalmente por monócitos e células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Salhi et al., 2008). Com isso, é possível que a produção de IL-10 em indivíduos expostos à saliva de *Lu. intermedia* favoreça

o estabelecimento da *L. braziliensis*. Em modelo experimental, demonstramos anteriormente que a exposição prévia a saliva de *Lu. intermedia* além de não proteger o camundongo, induz um aumento da infecção por *L. braziliensis* (De Moura et al., 2007).

É sabido que na LC causada *L. braziliensis*, a formação da úlcera está associada a uma resposta inflamatória exacerbada com presença de IFN- $\gamma$  e TNF (Bacellar et al., 2002; Antonelli et al., 2005; Machado et al., 2002; Almeida et al., 1999). Adicionalmente, na lesão da LC observa-se um infiltrado inflamatório com presença de linfócitos e macrófagos e escassez ou ausência de parasitas (Bittencourt et al., 1991; Faria et al., 2005). Todavia, em biópsias obtidas de indivíduos com leishmaniose cutânea recente, quando ainda não se observa a formação da úlcera, há baixa produção de IFN- $\gamma$  a antígenos de *L. braziliensis* e grandes número de parasitas (Rocha et al., 1999). Assim, é possível que a produção de IL-10 a antígenos da saliva contribua para modulação da resposta imune inicial contra o parasita. Não podemos descartar a possibilidade da IL-10 estar atuando no sentido de modular a resposta inflamatória observada na LC ativa. Contudo, em indivíduos com LC e LM ativa, a adição de IL-10 recombinante não foi capaz de modular a produção de IFN- $\gamma$  por CMSP de maneira satisfatória (Bacellar et al., 2002).

A estimulação com SGS induziu um aumento na frequência de células T CD4<sup>+</sup> expressando CD25, sugerindo que a estimulação antigênica está ativando as células T. Adicionalmente, encontramos aumento na frequência de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) após estímulo com saliva. Estudos têm documentado células T reguladoras produzindo IL-10 em lesões de LC (Campanelli et al., 2006; Costa et al., 2013). Detectamos que a principal fonte de IL-10 foram às células T CD4<sup>+</sup> e suas subpopulações CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. De maneira diferente, em residentes em área de transmissão de *L. major* na Tunísia, a principal fonte produtora de IL-10 em resposta a saliva de *P. papatasi* foi a célula T CD8<sup>+</sup> (Abdeladhim et al., 2011). Além disso, detectamos tanto a produção de IFN- $\gamma$  após estímulo com SGS de *Lu. intermedia* quanto a expressão de genes induzidos por IFN. Nesse sentido, já foi documentado que animais deficientes de *Irgm1* ou de outras GTPases são suscetíveis à infecção por *L. major* (Feng et al., 2009). Ainda é necessário caracterizar a população celular responsável pela produção de IFN- $\gamma$ . A CXCL9, uma quimiocina induzida por IFN- $\gamma$ , é capaz de recrutar e auxiliar células T (Liaof et al., 1995). Documentamos que CMSP de indivíduos expostos à saliva de *Lu. intermedia* expressam RNA que codifica CXCL9 e também produzem a proteína quando estimuladas com SGS. Observamos também uma significativa secreção de CCL2 nas CMSP de indivíduos expostos à saliva. De fato, tanto

a saliva de *Lu. intermedia* (De Moura et al., 2010) quanto de *Lu. longipalpis* (Teixeira et al., 2005) induzem a produção de CCL2. Uma vez que essa quimiocina está associada com o recrutamento de macrófagos, sugeriu-se que a *Leishmania* poderia explorar esse efeito para estabelecer a infecção no hospedeiro vertebrado.

Por fim, documentos que a exposição natural à saliva do *Lu. intermedia* constitui um risco para o desenvolvimento de LC causada por *L. braziliensis*. Na Tunísia, um estudo prospectivo demonstrou que anticorpos anti-SGS de *P. papatasi* induziam também um aumento do risco de desenvolver LC por *L. major* (Marzouki et al., 2011). Contudo, são necessários estudos para compreensão dos mecanismos envolvidos nessa associação entre resposta imune anti-saliva e aumento do risco para LC. É possível que a produção de IL-10 encontrada em resposta à saliva esteja envolvida no preparo de um ambiente favorável para o estabelecimento da *L. braziliensis*.

## PERSPECTIVAS DE ESTUDO

A utilização de anticorpos anti-SGS de flebotomíneos como marcadores de exposição ao vetor além do uso como ferramenta para monitoramento da população do inseto foi testada em diversas áreas de transmissão de *Leishmania* (Rohousova et al., 2005; Clements et al., 2010; Marzouki et al., 2011). Todavia, existem algumas limitações no uso do SGS em ensaios epidemiológicos, incluindo a necessidade de criação de colônias de laboratório ou a captura dos flebotomíneos no campo. Uma alternativa é a utilização de proteínas recombinantes da saliva nesses estudos de exposição ao flebótomo. Em uma área endêmica de LV no Brasil foi visto que duas proteínas da saliva de *Lu. longipalpis* (LJM11 e LJM17) foram reconhecidas por soros de indivíduos residentes da localidade (Teixeira et al., 2010). Posteriormente esses dados foram validados em uma amostra de 1077 indivíduos e observou-se que a combinação dessas duas proteínas aumentou significativamente os níveis de detecção (Souza et al., 2010). Em uma região endêmica de LC na Tunísia foi documentado que a proteína PpSP32 da saliva de *P. papatasi* é o antígeno imunodominante e um bom marcador de exposição ao vetor (Marzouki et al., 2012). No presente trabalho, observamos que soros de indivíduos residentes em área endêmica de LT reconhecem diversas proteínas da saliva de *Lu. intermedia*. Desse modo, pretendemos utilizar proteínas recombinantes da saliva de *Lu. intermedia* para caracterizar com mais precisão a resposta humoral de indivíduos expostos naturalmente, uma vez que uma ou mais dessas proteínas possam ser usada como marcador de exposição.

Outro aspecto é que diferentes proteínas da saliva podem induzir diferentes tipos de resposta imune do hospedeiro e, conseqüentemente, desfechos clínicos distintos. Camundongos C57BL/6 imunizados com PpSP15 da saliva de *P. papatasi* controlaram a infecção subsequente por *L. major* e, nesse caso a proteção foi associada com um aumento de células T CD4<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  (Oliveira et al., 2008). Alternativamente, a imunização com a proteína PpSP44 presente na saliva do mesmo flebótomo gerou uma resposta Th2 e induziu a exacerbação da infecção pelo mesmo agente. Com relação à saliva de *Lu. intermedia* foi mostrado que a imunização com o SGS induz um aumento da infecção por *L. braziliensis* (De Moura et al., 2007). Em contraste, a imunização com a proteína Linb-11 resultou na diminuição do tamanho da lesão com redução da carga parasitária e aumento na frequência de células T CD4<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  (De Moura et al., 2013). Com base nesses

achados, torna-se interessante investigar quais proteínas da saliva de *Lu. intermedia* estão associadas com a produção de IL-10 e/ou de IFN- $\gamma$  em humanos. No presente estudo, documentamos que indivíduos naturalmente expostos à picada do vetor apresentaram uma resposta imune celular mista com presença de IFN- $\gamma$  e IL-10, portanto, é possível que proteínas diferentes estejam induzindo a produção de citocinas distintas.



## CONCLUSÕES

- Indivíduos naturalmente expostos à saliva de *Lu. intermedia* desenvolveram resposta humoral com presença de anticorpos IgG e predominância das subclasses IgG1 e IgG4.
- A elevada resposta de IgG anti-saliva está associada com a chegada em casa após as 16 horas.
- Indivíduos naturalmente expostos à saliva de *Lu. intermedia* desenvolvem resposta celular com produção aumentada de IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , CXCL9 e CCL2 em culturas de CMSP estimuladas com SGS.
- A principal fonte de IL-10 são as células T CD4<sup>+</sup>, incluindo as subpopulações CD25<sup>+</sup> e FOXP3<sup>+</sup>.
- Não houve correlação entre a resposta imune humoral anti-saliva de *Lu. intermedia* e a resposta imune celular para *Leishmania* (DTH).
- O risco de desenvolver LC é 11% mais elevado em indivíduos expostos à saliva de *Lu. intermedia*.

## SUMMARY

### **EVALUATION OF THE IMMUNE RESPONSE TO *Lutzomyia intermedia* SALIVA IN INDIVIDUALS FROM A TEGUMENTARY LEISHMANIASIS ENDEMIC AREA.**

Sand fly saliva contains a variety of pharmacologic agents, such as anticoagulants, vasodilators, immunomodulatory and anti-inflammatory molecules. Differently from others parasite/vectors interactions, prior immunization with the *Lu. intermedia* saliva, one of the vectors of *Leishmania braziliensis* in Brazil, enhancement of *Leishmania* infection in mice. In addition, patients with active ulcers displayed higher levels of anti-*Lu. intermedia* saliva antibodies when compared with individuals with sub-clinical *L. braziliensis* infection, suggesting that exposure to sand flies saliva influences the outcome of *L. braziliensis* infection. In the present work we characterize the immune response against *Lu. intermedia* saliva in residents of *L. braziliensis* endemic area. Participants in the present study included 264 individuals living in the endemic area of Corte de Pedra, Bahia, were evaluated regarding serology and cellular immune response to *Lu. intermedia* saliva. Anti-*Lu. intermedia* saliva antibodies was found in 150 (56.8%) subjects and a positive serology was associated with home arrival after 16h (p=0.01). Moreover, there was a predominance of IgG1 and IgG4 Immunoglobulin subclass. Cytokines and chemokine production were determined by ELISA in supernatants of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Individuals naturally exposed to *Lu. intermedia* bites displayed higher concentrations of IL-10, IL-13 and IFN- $\gamma$  compared to controls whereas TNF levels were similar in both groups. In addition, subjects exposed to sand fly Saliva secrete high levels CXCL9 and CCL2 than controls. Furthermore, the main sources of IL-10-secreting cells are CD4<sup>+</sup>, including CD25<sup>+</sup> and Foxp3<sup>+</sup> subsets. This type of immune response, with high IL-10 and IL-13 concentrations, may favor the *L. braziliensis* infection and facilitate the proliferation of the parasite co-inoculated with the saliva. Moreover, we also observed that individuals with active Cutaneous Leishmaniasis (CL) presented higher antibody levels (p<0.05) when compared with individuals presenting a cellular immune response to *Leishmania* (DTH+), suggesting an association between exposure to *Lu. Intermedia* and risk of developing disease. In fact, analyzing 231 individuals, residing in Corte de Pedra, who tested negative for DTH response against *Leishmania* in 2010, we observed that 23 (9.9%) developed CL and, among these, 14 (60.8%) displayed positive serology to *Lu. Intermedia* salivary antigens. This result implies that the risk of developing CL is 11% higher in individuals exposed to *Lu. Intermedia* saliva.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdeladhim M, Ben Ahmed M, Marzouki S, Belhadj Hmida N, Boussoffara T, Belhaj Hamida N, Ben Salah A, Louzir H. Human cellular immune response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* is mediated by IL-10-producing CD8<sup>+</sup> T cells and Th1-polarized CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e1345, 2011.
- Almeida R, D'Oliveira A Jr, Machado P, Bacellar O, Ko AI, de Jesus AR, Mobashery N, Brito Santos J, Carvalho EM. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 180: 1735-7, 1999.
- Alvar1 J, Vélez I, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Den Boer M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos One* 7: e35671, 2012.
- Antonielle L, Dutra W, Almeida R, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob K. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 101: 226-30, 2005.
- Aquino D, Caldas A, Miranda J, Silva A, Barral-Netto M, Barral A. Epidemiological study of the association between anti-*Lutzomyia longipalpis* saliva antibodies and development of delayed-type hypersensitivity to *Leishmania* antigen. *Am J Trop Med Hyg* 83: 825-7, 2010.
- Bacellar O, Lessa H, Schtiefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra W, Gollob K, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and immunity* 70: 6734-40, 2002.
- Báfica A, Oliveira F, Freitas A, Nascimento G, Barral A. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. *Int J Dermatol* 42: 203-7, 2003.
- Barral A, Barral-Netto M, Almeida R, De Jesus A, Grimaldi Junior G, Netto E, Santos I, Bacellar O, Carvalho EM. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *Am J Trop Med Hyg* 47: 587-592, 1992.
- Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 53: 256-259, 1995.
- Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, Rowton ED, Valenzuela J, Charlab R, Barral-netto M, Ribeiro J. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 62: 740-5, 2000.
- Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM; Reed S. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology* 17:21-28, 1995.
- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL. 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* 194: 1497-506, 2001.
- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks D. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector

saliva and saliva pre-exposure on the long-term outcome of *Leishmania* major infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 10: 1441-53, 1998.

Ben Salah A, Louzir H, Chlif S, Mokni M, Zaatour A, Raouene M, Ismail RB, Dellagi K. The predictive validity of naturally acquired delayed-type hypersensitivity to leishmanin in resistance to *Leishmania* major-associated cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infect Diseases* 11:1981-7, 2005.

Bezerra H, Teixeira M. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) Salivary Gland Lysates on *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Infection in BALB/c Mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 349-351, 2001.

Bittar R, Nogueira R, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos M, Oliveira-neto M, Coutinho S, Cruz A. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102: 625-3, 2007.

Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem inst oswaldo cruz* 86: 51-56, 1991.

Brasil, Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. *Série A normas e manuais técnicos*. 2º edição, 2007.

Brodie T, Smith M, Morris R, Titus R. Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect Immun* 75: 2359–65, 2007.

Brodskyn C, Barral A, Boaventura V, Carvalho EM, Barral-Netto M. Parasite-driven *in vitro* human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *Journal of immunology* 159: 4467-73, 1997.

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* 96: 21-8, 2002.

Campanelli A, Roselino A, Cavassani K, Pereira M, Mortara R, Brodskyn C, Gonc H, Belkaid Y, Barral-Netto M, Barral A, Silva J. CD4+CD25+ T Cells in Skin Lesions of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Exhibit Phenotypic and Functional Characteristics of Natural Regulatory T Cells. *J Infect Dis* 193:1313–22, 2006.

Carregaro V, Sa-Nunes A, Cunha TM, Grespan R, Oliveira CJ, Lima-Junior DS, Costa DL, Verri WA Jr, Milanezi CM, Pham VM, Brand DD, Valenzuela JG, Silva JS, Ribeiro JM, Cunha FQ. Nucleosides from *Phlebotomus papatasi* salivary gland ameliorate murine collagen-induced arthritis by impairing dendritic cell functions. *Journal of immunology* 187: 4347–59, 2011.

Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *Journal of immunology* 15: 5949-56, 1994.

Carvalho EM, Johnson W, Barreto E, Marsden P, Costa J, Reed S, Rocha H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Journal of immunology* 135: 4144-8, 1985.

Castellucci L, Cheng L, Araújo C, Guimarães L, Lessa H, Machado P, Almeida M, Oliveira A, Ko A, Johnson W, Wilson M, Carvalho E, De Jesus A, Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 69–73, 2005.

Charlab R, Valenzuela J, Rowton E, Ribeiro J. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 29: 155-60, 1999.

Clements MF, Gidwani K, Kumar R, Hostomska J, Dinesh DS, Kumar V, Das P, Müller I, Hamilton G, Volfova V, Boelaert M, Das M, Rijal S, Picado A, Volf P, Sundar S, Davies CR, Rogers ME. Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral Leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *Am J Trop Med Hyg* 82: 801-7, 2010.

Collin N, Gomes R, Teixeira C, Cheng L, Laughinghouse A, Ward JM, Elnaiem DE, Fischer L, Valenzuela JG, Kamhawi S. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. *PLoS Pathog* 5: e1000441, 2009.

Costa D, Guimarães L, Cardoso T, Queiroz A, Lago E, Roselino A, Bacellar O, Carvalho EM, Silva JS. Characterization of regulatory T cell (Treg) function in patients infected with *Leishmania braziliensis*. *Hum Immunol* 13: 198-8859, 2013.

De Moura T, Oliveira F, Carneiro M, Miranda J, Clarêncio J, Barral-Netto M, Brodskyn C, Barral A, Ribeiro J, Valenzuela J, de Oliveira CI. Functional transcriptomics of wild-caught *Lutzomyia intermedia* salivary glands: identification of a protective salivary protein against *Leishmania braziliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis*: 5: e2242, 2013.

De Moura T, Oliveira F, Novais F, Miranda J, Clarêncio J, Follador I, Carvalho EM, Valenzuela J, Barral-netto M, Barral A, Brodskyn C, De Oliveira C. Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. *Plos Negl Trop Dis* 28;12:e84, 2007.

De Moura T, Oliveira F, Rodrigues G, Carneiro M, Fukutani K, Novais F, Miranda J, Barral-Netto M, Brodskyn C, Barral A, de Oliveira CI. Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e712, 2010.

Faria D, Gollob K, Barbosa Jr J, Schriefer A, Machado P, Lessa H, Carvalho L, Romano-Silva M, Ribeiro de Jesus A, Carvalho EM, Dutra W. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and immunity* 73: 7853–7859, 2005.

Feng CG, Zheng L, Lenardo MJ, Sher A. Interferon-inducible immunity-related GTPase Irgm1 regulates IFN gamma-dependent host defense, lymphocyte survival and autophagy. *Autophagy* 5: 232-4, 2009.

Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo C, Carvalho L, Almeida R, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin infec dis* 11: E54-8, 2002.

- Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YA, Siddig M, Hashim FA, el-Hassan AM, Russo DM, Reed SG. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest* 92: 324-9, 1993.
- Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho L, Delavechia T, Carvalho EM, Bacellar O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect. Dis* 75: 1471-2334, 2012.
- Gomes R, Brodskyn C, de Oliveira CI, Costa J, Miranda J, Caldas A, Valenzuela J, Barral-Netto M, Barral A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis* 186: 1530-4, 2002.
- Gomes R, Oliveira F, Teixeira C, Meneses C, Gilmore DC, Elnaiem DE, Kamhawi S, Valenzuela JG. Immunity to sand fly salivary protein LJM11 modulates host response to vector-transmitted leishmania conferring ulcer-free protection. *J Invest Dermatol* 12: 2735-43, 2012.
- Gomes R, Teixeira C, Teixeira M, Oliveira F, Menezes M, Silva C, De Oliveira CI, Miranda J, Elnaiem D, Kamhawi S, Valenzuela J, Brodskyn C. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci USA* 22: 7845-50, 2008.
- Hasko G, Kuhel D, Chen J, Schwarzschild M, Deitch E, Mabley J, Marton A, Szabo C. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- $\alpha$  production via adenosine A2a receptor dependent and independent mechanisms. *FASEBJ* 14: 2065-2074, 2000.
- Hasko G, Szabo C, Nemeth Z, Kvetan V, Pastores S, Vizi E. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF  $\alpha$ , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *Journal of immunology* 157: 4634-4640, 1996.
- Ismail A, El Hassan AM, Kemp K, Gasim S, Kadaru AE, Moller T, Kharazmi A, Theander TG. Immunopathology of post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL): T-cell phenotypes and cytokine profile. *J Pathol* 189:615-22, 1999.
- Jirmanus L, Marshall J, Guimarães L, Lago E, Rosa M, Machado P, Carvalho EM. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg* 86: 426-433, 2012.
- Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290:1351-1354, 2000.
- Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*. 166: 1141-7, 2001.
- Katz O, W aitumbi J, Zer R, Warburg A. Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sand fly saliva. *Am.J.Trop.Med. Hyg* 62: 145-150, 2000.
- Lerner E, Ribeiro J, Nelson R, Lerner M. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 266: 11234-6, 1991.

- Lessa H, Machado P, Lima F, Cruz A, Bacellar O, Guerrreiro J, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg* 65: 87-9, 2001.
- Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 182:1301-14, 1995.
- Llanos Cuentas E, Cuba C, Barreto A, Marsden P. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 845-6, 1984.
- Machado P, Araújo C, Da Silva A, Almeida R, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A, Carvalho EM. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin infec dis* 34: E69-73, 2002.
- Machado P; Lessa H, Guimarães L, Bang H, Ho J, Carvalho EM. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infec Dis* 44: 788-93, 2007.
- Marzouki S, Abdeladhim M, Abdessalem CB, Oliveira F, Ferjani B, Gilmore D, Louzir H, Valenzuela JG, Ben Ahmed M. Salivary antigen SP32 is the immunodominant target of the antibody response to Phlebotomus papatasi bites in humans. *PLoS Negl Trop Dis* 6 :e1911, 2012.
- Marzouki S, Ben Ahmed M, Boussoffara T, Abdeladhim M, Ben Aleya-Bouafif N, Namane A, Hamida NB, Ben Salah A, Louzir H. Characterization of the antibody response to the saliva of Phlebotomus papatasi in people living in endemic areas of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 84: 653–61, 2011.
- Mbow M, Bleyenbergh J, Hall L, Titus R. Phlebotomus papatasi Sand Fly Salivary Gland Lysate Down-Regulates a Th1, but Up-Regulates a Th2, Response in Mice Infected with *Leishmania major*. *Journal of Immunology* 161: 5571–5577, 1998.
- Menezes M, Costa D, Clarêncio J, Miranda J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn C, de Oliveira CI. Immunomodulation of human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva. *BMC Immunol* 9: 1471-217, 2008.
- Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade AS, Antunes CM, Carneiro M. Risk factors for Leishmania chagasi infection in an urban area of Minas Gerais State. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 456-63, 2005.
- Morris R, Shoemaker C, David J, Lanzaro G, Titus R. Sandfly maxadilan exacerbates infection with Leishmania major and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *Journal of immunology* 167: 5226–30, 2001.
- Norsworthy N, Sun J, Elnaïem D, Lanzaro G, Soong L. Sand Fly Saliva Enhances *Leishmania amazonensis* Infection by Modulating Interleukin-10 Production. *Infection and immunity* 72: 1240–1247, 2004.
- Novais F, Carvalho L, Graff J, Beiting D, Ruthel G, Roos D, Betts M, Goldschmidt M, Wilson M, de Oliveira CI, Scott P. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog* 9: e1003504, 2013.

- Oliveira F, Bafica A, Rosato AB, Favali CB, Costa JM, Cafe V, Barral-Netto M, Barral A. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 85: 70-3, 2011.
- Oliveira F, Lawyer PG, Kamhawi S, Valenzuela JG. Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e226, 2008.
- Oliveira F, Traoré B, Gomes R, Faye O, Gilmore D, Keita S, Traoré P, Teixeira C, Coulibaly C, Samake S, Meneses C, Sissoko I, Fairhurst R, Anderson J, Doumbia S, Kamhawi S, Valenzuela J. Delayed-type hypersensitivity to sand fly saliva in humans from a leishmaniasis-endemic area of Mali is Th1-mediated and persists to midlife. *J Invest Dermatol* 133: 452-9, 2013.
- Peng Z, Beckett AN, Engler RJ, Hoffman DR, Ott NL, Simons FE. Immune responses to mosquito saliva in 14 individuals with acute systemic allergic reactions to mosquito bites. *J Allergy Clin Immunol* 114: 1189-94, 2004.
- Reed, S, Badaró R, Carvalho EM, Lorenço R; Lisboa A, Texeira R, Johnson W, Jones T. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 35; 79-85, 1986.
- Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM . Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz j biol res, Brasil* 31: 43-148, 1998.
- Ribeiro J. Vector saliva and its role in parasite transmission. *Exp Parasitol* 69: 104–6, 1989.
- Rocha P, Almeida R, Bacellar O, Ribeiro de Jesus A, Correa Filho D, Cruz A, Barral A, Coffman R, Carvalho EM. Down-Regulation of Th1 Type of Response in Early Human American Cutaneous Leishmaniasis. *J Infect Dis* 180:1731–4, 1999.
- Rohousova I, Ozensoy S, Ozbel Y, Volf P. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130: 493–9, 2005.
- Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55: 453-83, 2001.
- Samuelson J, Lerner E, Tesh R, Titus R. A Mouse Model of *Leishmania braziliensis braziliensis* Infection Produced by Coinjection with Sand Fly Saliva. *J Exp Med* 173: 49-54, 1991.
- Santos C, Boaventura V, Cardoso R, Tavares N, Lordelo M, Noronha A, Costa J, Borges V, de Oliveira C, Weyenbergh J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn C. CD8+ Granzyme B+ Mediated Tissue Injury Versus CD4+IFN $\gamma$ +Mediated Parasite Killing in Human Cutaneous Leishmaniasis. 2013.
- Scott P, Pearce E, Cheever A, Coffman R, Sher A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunology review* 112:161-182, 1989.
- Scott P, Sacks D, Sher A. Resistance to macrophage-mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. *Journal of immunology* 131: 966-971, 1983.
- Sher A, Sacks D, Scott P. Host and parasite factors influencing the expression of cutaneous leishmaniasis. *Ciba foundation symposium* 99: 174-189, 1983.



Souza AP, Andrade BB, Aquino D, Entringer P, Miranda JC, Alcantara R, Ruiz D, Soto M, Teixeira CR, Valenzuela JG, de Oliveira CI, Brodskyn CI, Barral-Netto M, Barral A. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas *PLoS Negl Trop Dis* 4: e649, 2010.

Tavares N, Silva R, Costa D, Pitombo M, Fukutani K, Miranda J, Valenzuela J, Barral A, De Oliveira CI, Barral-Netto M, Brodskyn C. *Lutzomyia longipalpis* saliva or salivary protein LJM19 protects against *Leishmania braziliensis* and the saliva of its vector, *Lutzomyia intermedia*. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1169, 2011.

Teixeira C, Gomes R, Collin N, Reynoso D, Jochim R, Oliveira F, Seitz A, Elnaiem DE, Caldas A, de Souza AP, Brodskyn CI, de Oliveira CI, Mendonca I, Costa CH, Volf P, Barral A, Kamhawi S, Valenzuela JG. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e638, 2010.

Teixeira CR, Teixeira MJ, Gomes RB, Santos CS, Andrade BB, Raffaele-Netto I, Silva JS, Guglielmotti A, Miranda JC, Barral A, Brodskyn C, Barral-Netto M. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol* 175: 8346-53, 2005.

Theodos C, Ribeiro J, Titus R. Analysis of Enhancing Effect of Sand Fly Saliva on *Leishmania* Infection in Mice. *Infection and immunity* 59: 1592-1598, 1991.

Titus R, Ribeiro J. Salivary Gland Lysates from the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Enhance *Leishmania* Infectivity. *Science* 239: 1306-1308, 1988.

Turetz, M, Machado P, Ko A, Alves F, Bittencout A, Almeida R, Mobashery N, Johnson WD, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 12: 1829-34, 2002.

Unger A, O'Neal S, Machado P, Guimarães L, Morgan D, Schriefer A, Bacellar O, Glesby M, Carvalho EM. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 80: 574-9, 2009.

Valenzuela J, Belkaid Y, Garfield M, Mendez S, Kamhawi S, Rowton E, Sacks D, Ribeiro J. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: Characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 194:331-342, 2001.

Vinhas V, Andrade B, Paes F, Bomura A, Clarêncio J, Miranda J, Báfica A, Barral A, Barral-Netto M. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. *Eur J Immunol* 37: 3111-21, 2007.

Wheat W, Pauken K, Morris R, Titus R. *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, and cytokine Secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic Tcells. *Journal of immunology* 180: 8286-8298, 2008.

World health organization (WHO). Control of the leishmaniasis. *WHO Technical Report Series*, Geneva, 949, 2010.

## **ANEXOS**

## **ANEXO 1**

Questionário de aspectos demográficos e epidemiológicos

# **Posto de Saúde de Corte de Pedra**

**(ILCF)**

## **VISITA DE CAMPO**

*Caso Índice*

**TMRC Brasil  
Projeto Leishmaniose Tegumentar**

**3. Número do ILCF** 1 1 1 1 1 1 1 \*

**4. Número do LTCP** 1 1 1 1 1 1 1 (\*) Campos obrigatórios

**SIM – Serviço de Imunologia**

**Hospital Universitário Professor Edgard Santos - UFBA**

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

4. N° do LTCP <input type="text"/>	3. N° do ILCF <input type="text"/>	5. N° da Família <input type="text"/>
6. N° do indivíduo na Família <input type="text"/>		
<b>Data da assinatura do TCLE para Estudo de incidência de LC e resposta imune:</b> ..... <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>		
<b>Dados Demográficos</b>		
14. Sexo:..... <input type="radio"/> masculino <input type="radio"/> feminino		
15. Data de nascimento* (dd/mm/aaaa):..... <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>		
16. Naturalidade: _____ 17. Ocupação:		
<input type="radio"/> Trabalhador rural <input type="radio"/> Dona de casa <input type="radio"/> Estudante <input type="radio"/> Comerciante <input type="radio"/> Motorista <input type="radio"/> Outra		
18. Cidade/Vilarejo* _____		
19. Tempo em endereço atual (anos):..... <input type="text"/>		
20. N° de moradores no domicílio (exceto paciente):..... <input type="text"/>		
21. N° de moradores no domicílio com leishmaniose passada ou ativa:..... <input type="text"/>		
191. Grau de parentesco com o caso índice:..... <input type="radio"/> Pai/mãe <input type="radio"/> Irmão <input type="radio"/> Filho <input type="radio"/> Outro		
<b>História Médica Progressiva</b>		
192. Leishmaniose cutânea ativa:..... <input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim		
Se “ <u>não</u> ” ir para item 200. Se “ <u>sim</u> ” preencher também itens 193 a 199 e 52 a 71.		
193. Já esteve no PSCP?..... <input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim		
194. Local da lesão: <input type="radio"/> Segmento cefálico <input type="radio"/> Tronco <input type="radio"/> MMSS <input type="radio"/> MMII <input type="radio"/> Genitália/glúteo		
195. N° de cicatrizes sugestivas de leishmaniose:..... <input type="text"/>		
196. Lesões acima da cintura:..... <input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim		
197. Ano de início da lesão cutânea: _____		
198. Tratado (antimonial) lesão cutânea:..... <input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim		
199. Completou o tratamento:..... <input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> em curso		
200. Leishmaniose mucosa:..... <input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim		
Se “ <u>não</u> ” ir para item 171. Se “ <u>sim</u> ” preencher também itens 201 a 203.		
201. Ano de diagnóstico da lesão mucosa: _____		
202. Tratada (antimonial) lesão mucosa:..... <input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim		
203. Completou o tratamento da lesão mucosa:..... <input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim <input type="radio"/> em curso		

<u>Exposição Ambiental</u>		
171. Você já trabalhou ou morou (pelo menos um mês) em fazenda?.....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
172. Possui animais em casa?.....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
4. N° do LTCP	1 1 1 1 1 1	3. N° do TMRC
		1 1 1 1 1 1*
		5. N° da Família
		1 1 1 1
<u>Exposição Ambiental (Continuação)</u>		
Se “ <u>não</u> ” possui animais em casa, ir para item 179. Se “ <u>sim</u> ”, especifique:		
173. Cachorros.....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
174. Cavalos.....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
175. Galinhas.....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
176. Porcos.....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
177. Outros.....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
178. Se “outros”, especifique: _____		
179. Há eletricidade em casa? .....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
180. Há sanitário em casa?.....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
181. Usa mosquiteiro para dormir?.....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
182. Há resto de mata próximo a casa (raio de 100 m).....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
183. Há roça próxima a casa (raio de 50 metros)?.....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
184. Há galinheiro próximo a casa (raio de 50 metros)?.....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
185. Há pocilga próxima a casa (raio de 50 metros)? .....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
186. Há curral próximo a casa (raio de 50 metros)? .....	0	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
187. Ocupação entre 16:00 e 24:00 hs:.....	0	<input type="radio"/> Permanece em casa <input type="radio"/> Sai de casa
188. Se “Sai de casa”, sai para:		
0	<input type="radio"/> Caçar/pescar.....	1
1	<input type="radio"/> Estudo/trabalho.....	2
2	<input type="radio"/> Outro	
189. Se “Sai de casa para outro”, especifique: _____		
<u>Exame Físico Médico (preencher itens 52 a 71, se respondeu “sim” no item 192)</u>		
52. N° total de lesões de pele:.....	1	1 1 1 1
53. Tempo de duração da lesão ativa (semanas):.....	1	1 1 1 1
<i>Número e tipos de lesões:</i>		
54. Ulceradas.....	1	1 1 1 1
55. Pápulas .....	1	1 1 1 1
56. Nódulos .....	1	1 1 1 1

57. Vegetações .....						
58. Verucosas.....						
<b>Lesão principal:</b>						
<b>59. Local maior lesão (marque apenas UM):</b>						
00 Cabeça	10 Face	20 Pescoço	30 Tronco	40 Braço D	50 Braço E	
60 Antebraço D	70 Antebraço E	80 Coxa D	90 Coxa E	100 Perna D	110 Perna E	120 Outro
60. Se "Outro", especificar: _____						

4. N° do LTCP	3. N° do ILCF               *	5. N° da Família
<b>Exame Físico Médico (Continuação)</b>		
Tamanho da maior lesão (mm):.....61a.         x 61b.		
62. Tipo da lesão: 00 ulcerada 10 pápula 20 nódulo 30 vegetação 40 verrucosa 50 NE		
63. Infecção secundária:.....00 não 10 sim 20 NE		
64. Cicatriz sugestiva de Leishmaniose cutânea:.....00 não 10 sim 20 NE		
65. N° de cicatrizes:.....		
66. Tempo de duração das cicatrizes (anos):.....		
<b>Linfadenopatia:</b>		
67. Linfadenopatia presente:.....00 não 10 sim 20 NE		
68. Mais de 1 cadeia envolvida:.....00 não 10 sim		
69. Local: 00 Cervical 10 Occipital 20 Axilar 30 Inguinal 40 Crural 50 Outra		
Tamanho do maior linfonodo (mm):.....70a.         x 70b		
71. Foto das lesões realizada:.....00 não 10 sim		
<b>Triagem Otorrinolaringológica</b>		
204. Lesões mucosas ativas:.....00 não 10 sim 20 NE		
205. Cicatriz característica de lesão mucosa:.....00 não 10 sim 20 NE		
206. Referido ao PSCP para exame ORL:.....00 não 10 sim		
<b>Coleta e Exames Realizados</b>		
190. Colhido sangue para genética:.....00 não 10 sim		
46. Realizada IDRm prévia*:.....00 não 10 sim 20 NE		

47. Se “sim”:	<input type="radio"/> POS <input type="radio"/> NEG <input type="radio"/> Duvidoso
48. Se “não”, realizado agora*:	<input type="radio"/> não <input type="radio"/> sim
Iniciais do entrevistador _____	
<b><u>Leitura da IDRM:</u></b>	
IDRM:	49a. <u>  </u> <u>  </u> <u>  </u> x 49b. <u>  </u> <u>  </u> <u>  </u> mm
50. IDRM:	<input type="radio"/> POS <input type="radio"/> NEG <input type="radio"/> Duvidoso
<b><u>Diagnóstico da Forma Clínica de Leishmaniose - Fenótipo</u></b>	
<b>207. Fenótipo da Forma Clínica:</b>	
<input type="radio"/> Cutânea (CL=0)..... <input type="radio"/> Mucosa (ML=1)..... <input type="radio"/> Disseminada (DL=2)	
<input type="radio"/> Cutâneo mucosa (MCL=3)..... <input type="radio"/> Pré-ulcerativa (4)..... <input type="radio"/> Sub-clínica (5)	
<input type="radio"/> Sem evidência de LT	
Iniciais do investigador _____	



## **ANEXO 2**

Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido

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

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

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

**Nº do Projeto:** \_\_\_\_\_

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

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

### **Convite e Objetivo:**

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

### **Participação voluntária:**

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

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

**Procedimentos:** Caso você aceite participar do estudo um questionário será feito para saber onde você mora, sua ocupação, seus hábitos e se você já teve leishmaniose. Um médico examinará você para ver se existe qualquer lesão que indique se você tem ou já teve leishmaniose. Também com o auxílio de uma lanterna e de um espéculo nós examinaremos você para ver se tem evidência de leishmaniose no nariz ou na boca. Caso seja detectada lesão

ativa na pele ou na mucosa, você será convidado a comparecer no posto de saúde de Corte de Pedra para realizar exames de rotina para o diagnóstico da doença, como exame de sangue (sorológico) e teste cutâneo onde vamos observar se você já teve contato ou não com a leishmaniose. Se você concordar em retirar sangue para realização dos estudos, 20 ml de sangue serão colhidos (equivalente a um pouco mais que 1 colher de sopa) por um profissional capacitado, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis.

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

**Análise de riscos e benefícios:** A retirada de sangue pode causar dor no local da punção com a agulha e raramente pode ocorrer sangramento ou formação de hematoma. O exame da sua pele, do seu nariz e da sua boca poderá documentar que você tenha leishmaniose cutânea ou leishmaniose mucosa. Neste caso você será tratado com antimônio (glucantime) o que trará vantagem para você desde que a doença foi documentada na sua fase ainda inicial. Este tratamento será acompanhado no Posto de Saúde de Corte de Pedra e caso haja necessidade, ou pela realização de exames, ou complicações do tratamento, você será internado no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos em Salvador. A passagem para Salvador será custeada pela pesquisa, contudo a vaga para internamento será de acordo com as normas do Hospital, sendo às vezes necessário esperar alguns dias para consegui-la.

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

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

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

**Consentimento:** Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste

consentimento lhe será entregue. Favor assinalar um dos quadros abaixo para indicar se deseja ou não ter as suas amostras de sangue armazenado para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

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

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão digital do participante      Data      Hora

\_\_\_\_\_  
Nome/Assinatura do pesquisador      Data      Hora

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
Nome/Assinatura da testemunha      Data      Hora

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

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

**Nome do paciente:** \_\_\_\_\_

**Número de identificação no Projeto:**

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

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

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

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

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

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ hora \_\_\_\_\_

Assinatura ou impressão digital do paciente

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ hora \_\_\_\_\_

Assinatura ou impressão digital do responsável

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ hora \_\_\_\_\_

Testemunha

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

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

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ hora \_\_\_\_\_

Investigador

## **ANEXO 3**

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



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

Rua Augusto Viana, s/nº, Canela – Hospital Universitário Professor Edgard Santos, 1º andar  
 Cep: 40.110-160 – Salvador-Bahia telefax: (71) 3283-8043 e-mail: cepmco@ufba.br homepage: www.cepemco.ufba.br

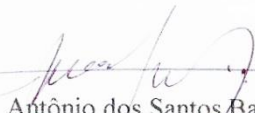
### PARECER/RESOLUÇÃO ADITIVA N.º 240/2009

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

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

*APROVADO*

Salvador, 30 de Outubro de 2009

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

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



## **ANEXO 4**

Normas de publicação da revista: The Journal of Infectious Diseases

## Revista: The Journal of Infectious Diseases

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

### Submission

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

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

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

### Language Editing Pre-Submission

Language editing, if your first language is not English, to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers, is available but optional. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. For further information on this service, please see [http://www.oxfordjournals.org/for\\_authors/language\\_services.html](http://www.oxfordjournals.org/for_authors/language_services.html). Several specialist language editing companies offer similar services and you can also use any of these. Authors are liable for all costs associated with such services.

### MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

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

1. Specify the type of article and adhere to the following limits:
  - Major Article: 3500 words, 50 references, 7 figures or tables in print, 3 figures or tables online
  - Brief Report: 2000 words, 15 references, 2 figures or tables in print, 3 figures or tables online
2. Include a cover letter with the following information:
  - A statement that the manuscript has not been submitted or accepted elsewhere
  - A statement that all authors fulfill the criteria given in the Authorship paragraph (see below)
  - A statement indicating whether any writing assistance other than copy editing was provided in the preparation of the manuscript
  - A list of 5 potential reviewers, with their e-mail addresses
3. All file names—for manuscript, cover letter, figures, tables—should contain no spaces between numbers or letters. File names may be run together (eg, authornamearticletitleversion1) or contain punctuation such as underscores, hyphens, or both (eg, author-name-article-title-version-1 or author\_name\_article\_title\_version\_1).
4. Ensure that the references are appropriately formatted in JID style
5. Ensure that all text, including tables and references, is double spaced
6. Ensure that the manuscript has page numbers. Authors are also requested to provide line numbers in the text section of the manuscript, though these are not required.
7. Use a title of no more than 160 characters and spaces and a running title of no more than 40 characters and spaces
8. Include the word count of the abstract and of the text
9. Include a footnote page with the following items:
  - A conflict of interest statement
  - A funding statement

- Mention of any meeting(s) where the information has previously been presented
  - Corresponding author contact information
10. Include 3–10 key words at the end of the abstract
  11. Include, in the Methods section, a statement regarding informed consent and human and/or animal experimentation guidelines, when indicated
  12. Include the registry number for a report of a clinical trial
  13. Provide written permission for all personal communications
  14. Provide accession numbers for nucleotide sequences
  15. Use only approved human genetic nomenclature and notation (see the relevant subsections of the "Manuscript Preparation" section, below)
  16. Submit newly identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) to the appropriate database; include previously recognized or recently submitted SNP numbers

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

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

*Major Articles* describe original investigations that are an important advance in the field and that have been brought to an acceptable degree of completion. Major Articles must be no longer than 3500 words of text (from the beginning of the introduction to the end of the discussion; do not count the abstract or the references), and illustrations must be limited to the minimum necessary for clear and concise presentation. For Major Articles describing results of clinical trials (see "Clinical trials registration," below), the abstract must be structured with the headings *Background*, *Methods*, *Results*, and *Conclusions* and must be no more than 200 words; for other Major Article manuscripts, the abstract may be structured (200-word limit) or unstructured (150-word limit). Major Articles are limited to a maximum of 7 inserts (tables and figures combined) in print, plus 3 online, and 50 references.

*Brief Reports* present complete studies that are narrower in scope than those described in Major Articles or that represent new developments. Manuscripts that are descriptive or primarily methodologic in nature, that report results of phase I and II vaccine trials (see "Clinical trials registration," below), or that describe *in vitro* chemotherapeutic studies should, in general, be submitted as Brief Reports. Brief Reports include an abstract (no more than 100 words) and are limited to no more than 2000 words of text, a total of 2 inserts (tables or figures) in print, plus 3 online, and 15 references.

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

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

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

*Reviews* that are research oriented will be considered. They should be no longer than 3500 words (from the beginning of the introduction to the end of the discussion) and have no more than 7 inserts (tables and figures combined) in print, 3 online, and 50 references. Authors should contact the Editor in advance of submission to determine whether a specific topic is deemed appropriate and timely.

### **Supplements**

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

### **Cover Letter**

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

### **Related Manuscripts**

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

### **Title Page**

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

### **Footnote Page**

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

### **Abstract**

The abstract for a Major Article describing results of a clinical trial must be no more than 200 words and must be structured with the headings *Background*, *Methods*, *Results*, and *Conclusions*. The trial must be registered (see "Clinical trials registration"), and the abstract must include the registry's URL and the trial's registration number. Abstracts of other Major Articles may be structured (200-word limit) or unstructured (150-word limit). Abstracts of Brief Reports should be no more than 100 words. Whether structured or unstructured, the abstract must state the purpose of the research, the methods used, the results, and the conclusions. Do not cite references in the abstract. Include 3-10 key words, separate from the abstract. Authors are reminded that the abstract is of particular value to producers and users of online literature retrieval systems such as MEDLINE.

### **Text**

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

### **Products**

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

### **Abbreviations**

Non-standard abbreviations should be defined at the first occurrence and introduced only where multiple use is made. Authors should not use abbreviations in headings.

Abbreviations do not need to be defined, even at first mention, if they are the standard abbreviations within AMA 10th edition (see pages 502–525).

### Statistical Analysis

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

### Units of Measure

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

### Funding

Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled "Funding." This should appear before the "Acknowledgment" section.

The following rules should be followed:

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

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

### Acknowledgments

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

### Conflict of Interests

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

### References

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

EndNote and Reference Manager are software programs for publishing and managing references/bibliographies, which are available from Thomson Reuters. If you use EndNote or Reference Manager to facilitate referencing citations, this journal's style is available for use. The EndNote program and relevant information can be found here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>. Please follow the instructions on this page regarding purchasing, downloading, and using the software; for technical support, see <http://www.endnote.com/contact/customer-support>.

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

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

information, if published. For online resources, include a URL and date accessed. Accuracy of references is the responsibility of the authors.

Examples of the proper format are as follows:

#### **Journal Article**

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

#### **Book chapter**

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

#### **Conference program**

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

#### **Internet site**

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

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

#### **Tables**

Major Articles are limited to a maximum of 7 inserts (tables and figures combined) in print and 3 online; Brief Reports are limited to a maximum of 2 inserts in print and 3 online. A single insert should not contain both tables and figures; possible exceptions are survival plots of time-to-event outcomes and pooled data in meta-analyses or other analyses that combine data from individual studies.

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

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

#### **Figures and Illustrations**

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

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

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

#### **Color Illustrations**

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

## PERMISSION TO REPRODUCE FIGURES AND EXTRACTS

Permission to reproduce copyright material, for print and online publication in perpetuity, must be cleared and if necessary paid for by the author; this includes applications and payments to DACS, ARS, and similar licensing agencies where appropriate. Evidence in writing that such permissions have been secured from the rights-holder must be made available to the editors. It is also the author's responsibility to include Acknowledgment as stipulated by the particular institutions. Please note that obtaining copyright permission could take some time. Oxford Journals can offer information and documentation to assist authors in securing print and online permissions: please see the Guidelines for Authors section at [http://www.oxfordjournals.org/access\\_purchase/rights\\_permissions.html](http://www.oxfordjournals.org/access_purchase/rights_permissions.html). Should you require copies of this, please contact the editorial office of *JID* in question or the [Oxford Journals Rights department](#).

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

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

## JOURNAL COPYEDITING STYLE

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