



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



**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI *LEISHMANIA* EM
INDIVÍDUOS ASSINTOMÁTICOS E EM INDIVÍDUOS
CURADOS EM UMA ÁREA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Juqueline Rocha Cristal

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2014

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

C933 Cristal, Juqueline Rocha
Avaliação da resposta anti *Leishmania* em indivíduos
assintomáticos e em indivíduos curados em uma área endêmica
para Leishmaniose Tegumentar Americana / Juqueline Rocha
Cristal. – Salvador, 2014.
78 f.
Orientadora: Prof^a Dr^a Aldina Maria Prado Barral.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Faculdade de Medicina, 2014.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Resposta Imune. 3. IDRM.
I. Barral, Aldina Maria Prado. II. Universidade Federal da
Bahia. III. Título.

CDU 616.929.5



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



AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI *LEISHMANIA* EM
INDIVÍDUOS ASSINTOMÁTICOS E EM INDIVÍDUOS
CURADOS EM UMA ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA

Juqueline Rocha Cristal

Professor-orientador: Profa Dra. Aldina Barral

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), 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- Profa. Dra. Maria Olívia Amado Ramos Bacellar, Doutora em Imunologia - Departamento de Imunologia – UFBA (Presidente).
- Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos – Doutor em Patologia – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz / FIOCRUZ.
- Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida, Doutor em Imunologia - Departamento de Medicina Interna e Patologia – UFSE.

Membro Suplente:

- Profa. Dra. Aldina Maria Prado Barral, Doutora em Patologia Humana - Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz / FIOCRUZ.

“De tudo, ficaram três coisas.

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro..."

Fernando Pessoa

*À Deus, pela vida e infinita graça. Aos meus
pais, Jucelino Cristal e Josinéa Amparo Rocha
Cristal, por todo amor e incentivo.*

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Instituições

- Universidade Federal da Bahia.
 - Faculdade de Medicina.
- Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ.
 - Laboratório de Imunoparasitologia.

EQUIPE

- Dra. Aldina Barral, Pesquisadora Titular do CPqGM-FIOCRUZ, Professora do PPgCS-UFBA.
- Dr. Jakson Maurício Costa, Pesquisador Titular da CPqGM-FIOCRUZ.
- Dra. Camila Indiani de Oliveira, Tecnologista CPqGM-FIOCRUZ, Professora do PPgCS-UFBA.
- Dra. Lourdes Farré, Pesquisadora do CPqGM-FIOCRUZ.
- Ms. Gisélia dos Santos Santana, Doutoranda em Biotecnologia do CPqGM-FIOCRUZ.
- Ms. Vanessa Nardy Doutoranda em Biotecnologia do CPqGM-FIOCRUZ.
- Sr. Antônio – técnico do campo.

FONTES DE FINANCIAMENTO

1. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB);
2. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
3. Bolsa de estudo da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
4. Suporte ao projeto do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM-FIOCRUZ).

AGRADECIMENTOS

À Dra. Aldina Barral pela orientação, incentivo, ensinamentos, oportunidade e acolhida no laboratório.

À Dra. Camila Indiani pelo incentivo, críticas, sugestões e orientações durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Manoel Barral-Netto pelas sugestões.

À Dra. Cláudia Ida Brodskyn pelas correções e apoio.

Ao Dr. Jackson Costa, Dr. Johan Van Weyenbergh e Dra. Lourdes Farré pela grande colaboração.

À Ms. Gisélia Santana, Ms. Vanessa Nardy e Sr. Antônio pela ajuda e colaboração.

Ao Dr. Dirceu Costa e Dra. Fernanda Novais pelo carinho, amizade e paciência nos ensinamentos quando cheguei ao laboratório.

À Dra. Ana Paula Almeida pela grande amizade, companheirismo e apoio durante todo o período e à Ms. Daniela Andrade pela amizade e colaboração.

À Fabiana Celes, Rebecca Curvelo, Augusto Carvalho, Régis Gomes, Vanessa Salgado e Petter Entringer pela amizade e grande ajuda neste momento.

Aos amigos do LIP e LIMI/CPqGM pelos dias alegres, troca de informações e contribuições.

À Jucelino Cristal, meu pai, pelo amor incondicional e dedicação.

À Josinéa Cristal, minha mãe, meu exemplo, pelas orações, dedicação e amor.

À Charles Ramos, meu esposo, por estar comigo em todos os momentos com muita paciência, carinho e apoio. Te amo!

Aos meus irmãos, razão da minha alegria, pelo aconchego do colo, risadas e torcida.

Aos meus sogros e cunhadas pelo carinho e preocupação.

Aos familiares, amigos de perto e de longe pela amizade e palavras de apoio.

Às secretárias do LIP/LIMI, Elze, Andrezza e Elaine pela amizade e imensa ajuda.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, à secretária do PPGCS, Ana Cibele e a todos os professores e funcionários.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz/FIOCRUZ e a Universidade Federal da Bahia.

MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE

Índice de tabelas	13
Índice de figuras	14
Índice de quadros.....	15
Lista de abreviaturas	16
I. Resumo	18
II. Objetivos	19
III. Introdução	20
IV. Revisão da literatura	23
IV.1. As leishmanioses: considerações gerais e epidemiologia	23
IV.2. Espécies, vetores e formas clínicas da LTA.....	26
IV.3. Mecanismos de transmissão da LTA.....	28
IV.4. Aspectos imunológicos.....	29
V. Casuística, materiais e métodos	31
V.1. Desenho de estudo	31
V.2. Critérios de inclusão	32
V.3. Critérios de não-inclusão	32
V.4. Coleta de sangue	33
V.5. Intradermorreação de Montenegro (IDRM)	33
V.6. Obtenção do antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>	33
V.7. Células mononucleares do sangue periférico - obtenção, estímulo e cultura.....	34
V.8. Dosagem de citocinas	34
V.9. Reação imunoenzimática para detecção de anticorpos anti <i>Leishmania</i>	36
V.10. Análise estatística	37
V.11. Aspectos éticos	37
V.12. Desenho experimental	38
VI. Resultados	39
VI.1. Aspectos epidemiológicos da população de estudo	39
VI.2. Dados demográficos dos 47 indivíduos participantes do estudo imunológico para avaliação das citocinas.....	42
VI.3. IDRM dos grupos estudados	44
VI.4. Perfil da produção de citocinas	45
VI.5. Correlação entre a produção de citocinas e Intradermorreação de Montenegro	50

VI.6. IGG total contra antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>	54
VII. Discussão	56
VIII. Perspectivas de estudo	61
IX. Conclusões	62
X. Summary	63
XI. Referências bibliográficas	64
Anexos	70
ANEXO 1	70
ANEXO 2	72
ANEXO 3	73

INDICE DE TABELAS

- TABELA 1.** Espécies de *Leishmania*, formas clínicas e principais vetores da LTA no Brasil. 26
- TABELA 2.** Resultados de IDRМ e sorologia nos indivíduos envolvidos nos inquéritos de 2006 e 2011, na área rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia. 39
- TABELA 3.** Distribuição dos 47 indivíduos em relação às variáveis grupo, idade e sexo da comunidade rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia. 42
- TABELA 4.** Frequência das variáveis sexo e idade dos 47 indivíduos da comunidade rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia. 43

INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Ciclo de vida da *Leishmania*, mostrando a fase do ciclo no hospedeiro invertebrado (flebotomíneo) e vertebrado (mamífero). 28
- FIGURA 2.** Área da IDRM dos indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea. 44
- FIGURA 3.** Concentração de citocina IFN- γ nos sobrenadantes de culturas de células de indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea (LC). 46
- FIGURA 4.** Produção de TNF- α nos sobrenadantes de culturas de células de indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea (LC). 47
- FIGURA 5.** Produção de IL-2 nos sobrenadantes de culturas de células de indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea (LC). 48
- FIGURA 6.** Produção de IL-10 nos sobrenadantes de culturas de células de indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea (LC). 49
- FIGURA 7.** Correlação entre a produção de IFN- γ ao antígeno solúvel de *Leishmania* e IDRM. 50
- FIGURA 8.** Correlação entre a produção de TNF- α ao antígeno solúvel de *Leishmania* e IDRM. 51
- FIGURA 9.** Correlação entre a produção de IL-2 ao antígeno solúvel de *Leishmania* e IDRM. 52
- FIGURA 10.** Correlação entre a produção de IL-10 ao antígeno solúvel de *Leishmania* e IDRM. 53
- FIGURA 11.** Sorologia anti *Leishmania* de *L. braziliensis* de indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea. 55

INDICE DE QUADROS

- QUADRO 1.** Distribuição dos grupos de indivíduos da população do estudo da área endêmica para LTA conforme a história prévia da doença e resposta da IDRМ. 32
- QUADRO 2.** Diluição seriada da curva padrão do Kit Cytometric Bead Array (CBA) para dosagem de citocinas. 35
- QUADRO 3.** IDRМ nos indivíduos participantes do inquérito de 2006, com ou sem histórico de Leishmaniose Cutânea, que foram positivos e realizaram a IDRМ no ano de 2011. 40
- QUADRO 4.** Sorologia nos indivíduos participantes do inquérito de 2006, com ou sem histórico de Leishmaniose Cutânea, que foram positivos e realizaram a IDRМ no ano de 2011. 41

LISTA DE ABREVIATURAS

CBA – Cytometric Bead Array

CMSP – Células mononucleares do sangue periférico

CUT OFF – ponto de corte

DO – Densidade óptica

DP – Desvio Padrão

ELISA – Enzyme Linked Immunoasorbent assay (Ensaio imunoenzimático).

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IDRM – Intradermorreação de Montenegro

IFN- γ – Interferon γ

IgG – Imunoglobulina

IL – Interlekin (Interceucina)

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose disseminada

LM – Leishmaniose mucosa

LRC – Leishmaniose Recidiva Cutis

LTA – Leishmaniose tegumentar

LV – Leishmaniose visceral

MS – Ministério da Saúde

NO – Óxido Nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

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

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

Th1 – Células T auxiliaadoras do tipo 1

Th2 – Células T auxiliaadoras do tipo 2

TNF – Tumor necrosis fator (Fator de necrose tumoral)

I. RESUMO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI *LEISHMANIA* EM INDIVÍDUOS ASSINTOMÁTICOS E EM INDIVÍDUOS CURADOS EM UMA ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. Introdução: A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) está entre as seis doenças prioritárias conforme a Organização Mundial de Saúde, acometendo cerca de 1 a 1,5 milhões de casos de indivíduos em todo o mundo, principalmente aqueles residentes em áreas tropicais e subtropicais do planeta. No Brasil, a LTA apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões, especialmente nas regiões Norte e Nordeste do país. Na Bahia a LTA tem a região Sudeste como circuito de produção mais importante, onde o distrito de Florestal, município de Jequié-Ba, destaca-se pela alta incidência da LTA nesta região nos últimos anos, representando 55,2% dos casos ocorridos no município. Nas infecções por *Leishmania* o hospedeiro pode desenvolver uma resposta imunológica específica, caracterizada pelo aumento de células T CD4+ e um perfil de citocinas Th1, demonstrado por teste *in vivo*, intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva e testes *in vitro*, como a produção de altos níveis de IFN- γ , TNF- α e desenvolvimento de lesão tecidual. A IDRM é amplamente usada para diagnóstico da LTA em pacientes com lesões cutâneas típicas e também tem sido usada para mensurar exposição à infecção por *Leishmania*. No entanto, existem indivíduos que vivem em áreas endêmicas que são infectados por *L. braziliensis*, mas que controlam a infecção e não desenvolvem doença. Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar a persistência da imunidade celular em indivíduos assintomáticos e curados na leishmaniose cutânea. Materiais e métodos: Uma sub população de uma coorte de indivíduos de uma área endêmica para Leishmaniose Cutânea (LC) foi caracterizada em termos de IDRM e antecedentes médicos de LC. Nós obtivemos amostras de sangue, bem como realização do teste da resposta de intradermorreação de Montenegro (IDRM) em 2006, na qual foi repetida essa avaliação em 2011. Em seguida, estabeleceu-se 4 grupos de indivíduos com base em seu status na avaliação de 2006 e 2011: indivíduos com histórico de LC (LC+), IDRM positivo (IDRM +) em 2006 e IDRM+ em 2011 (n = 11); LC-, IDRM+ e IDRM+ (n=10); LC-, IDRM- e IDRM+ (n = 12) e LC-, IDRM-, IDRM-(n = 14). Em 2011, as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram obtidas de todos os grupos e estimuladas *in vitro* com antígeno de *Leishmania* para determinar a produção de citocinas. Resultados: Em 2011, após cinco anos da avaliação inicial (2006) indivíduos LC+ e LC- com IDRM+ em ambos os períodos, produziram altos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-2 do que aqueles que foram LC-, IDRM- em 2006 e apresentaram IDRM+ em 2011 e os LC- e IDRM- nos dois períodos. Além de ter encontrado uma correlação significativa entre a IDRM e produção das citocinas acima. Conclusão: Dessa forma podemos concluir que a resposta imune celular *in vivo* e *in vitro* de indivíduos com a forma assintomática da doença é tão potente e duradoura quanto a de indivíduos com passado de leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: 1. Leishmaniose Cutânea; 2. Resposta imune; 3. IDRM.

II. OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a persistência da imunidade celular e humoral em indivíduos assintomáticos e curados na leishmaniose cutânea.

ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de produção de citocinas nas células em indivíduos após re-estimulação com antígeno específico de *Leishmania* com intradermoreação de Montenegro (IDRM) negativa e IDRM positiva.
- Correlacionar a produção de citocinas com a IDRM dos indivíduos do estudo.
- Avaliar a resposta humoral ao antígeno de *L. braziliensis* em indivíduos assintomáticos e curados em uma área endêmica de Leishmaniose Cutânea.

III. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária que acomete cerca de 12 a 15 milhões de indivíduos em todo o mundo, principalmente aqueles residentes em áreas tropicais e subtropicais do planeta. Aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção, na qual são notificados 1,3 milhões de novos casos e 30 mil mortes anualmente. A leishmaniose constitui um crescente problema de saúde pública, acometendo boa parte dos continentes, sendo que mais de 98 países e territórios são endêmicos para esta doença (WHO, 2013).

As leishmanioses são doenças transmitidas por insetos vetores, que tem como agente etiológico protozoários do gênero *Leishmania* (Filo Sarcomastigofora, Ordem Kinetoplastidae, Família Tripanosomatidae), sendo em sua maioria zoonoses de animais silvestres. Estas protozoonoses despertam atenção, especialmente quanto a sua importância médica e econômica, encontrando-se a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) entre as seis doenças infecto-parasitárias prioritárias no programa de controle conforme a Organização Mundial de Saúde (BRASIL, 2007).

A LTA é causada predominantemente pelas *Leishmania braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana* e *L. amazonensis*. É uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas (BRASIL, 2007). A transmissão da doença ocorre no ato da hematofagia pelas fêmeas infectadas de dípteros pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e ao gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo (WHO, 2013).

Nas Américas, o Brasil é o país com maior número de casos de Leishmaniose Cutânea, sendo registrados 26 mil casos por ano e incidência anual estimada de 72.800 (ALVAR, 2012). No Brasil, a LTA apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões com números crescentes nos últimos anos onde as regiões Norte e Nordeste foram as mais afetadas (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Na região Nordeste, a Bahia é o segundo estado em relatar maior incidência da leishmaniose, com número de casos de Leishmaniose Cutânea girando em torno de 23 casos para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2007). O município de Jequié apresenta um histórico importante de Leishmaniose Visceral (LV), mas também foram notificados casos de LTA, no

qual dos anos de 2001 a 2006, foram atendidos nas unidades de saúde aproximadamente 300 casos de LTA. O distrito de Florestal, pertencente ao município de Jequié-Ba, situado na zona de mata Atlântica, notificações mostraram que esta região representa 55,2% dos casos de LT, representando a maior concentração de casos no Município, constituindo assim área endêmica importante de Leishmaniose Tegumentar (CERDEPS, 2003).

As leishmanioses são transmitidas a partir da picada de insetos, os flebotomíneos. Apenas as fêmeas são hematófagas (PRATES et al., 2008). O ciclo de vida da *Leishmania* tem início quando uma fêmea ingere formas amastigotas do parasito durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado. As amastigotas são ingeridas juntamente com sangue, livres ou dentro das células hospedeiras, os macrófagos. Dentro do intestino do inseto vetor o parasito se multiplica e se desenvolve até a forma infectiva para os hospedeiros vertebrados, as promastigotas metacíclicas. A transmissão do parasito ocorre quando o flebotomíneo infectado faz um segundo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado. Neste momento as metacíclicas são inoculadas na pele do vertebrado juntamente com a saliva. (KAYE & SCOTT, 2011).

Após a inoculação do parasito, a infecção e ocasionalmente o desenvolvimento de úlcera e o estabelecimento da doença ocorre em alguns indivíduos infectados. A doença induz uma resposta imunológica específica nos hospedeiros infectados. A resposta específica é caracterizada pelo estímulo de células T CD4⁺ e um perfil de citocinas Th1 ao antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), demonstrado por teste *in vivo*, intradermoreação de Montenegro positiva (IDRM) e testes *in vitro*, como a produção de altos níveis de IFN- γ , TNF- α e desenvolvimento de lesão tecidual (BACELLAR et al., 2002). Paralelamente a essa resposta, a sobrevivência da *Leishmania* depende da evasão do sistema imune do hospedeiro, sendo que este parasito é altamente adaptado ao escape da resposta imune humoral e celular desenvolvida pelo hospedeiro (SACKS & SHER, 2002; ZAMBRANI-VILLA et al., 2002).

A IDRM é amplamente usada para diagnóstico da LTA em pacientes com lesões cutâneas típicas e também tem sido usada, juntamente com a avaliação clínica e parasitológica, para mensurar exposição à infecção por *Leishmania*. No entanto, existem indivíduos que vivem em áreas endêmicas que são infectados por *L. braziliensis*, mas que controlam a infecção e não desenvolvem doença, ou seja, apresentam a IDRM positiva na ausência de manifestações clínicas da LTA (SCHNORR et al., 2012). A positividade da reação é um achado comum em indivíduos de área endêmica e os percentuais variam em

diferentes regiões, muitas vezes atribuído as diferenças da procedência ou preparo do antígeno.

Com base nesses fatos, buscamos investigar a persistência de resposta aos antígenos de *Leishmania* numa área endêmica após surtos de LTA nesta população, realizando dois inquéritos com 5 anos de intervalo (2006 e 2011) em indivíduos assintomáticos e curados, avaliando a IDRM e a produção de citocinas após re-estimulação *in vitro* com SLA. Através da investigação da resposta imune anti *Leishmania* nestes indivíduos, esperamos fornecer informações úteis que possam trazer melhor entendimento da resposta protetora e contribuir para o desenvolvimento de vacinas nas leishmanioses.

IV. REVISÃO DA LITERATURA

IV.1. AS LEISHMANIOSES: CONSIDERAÇÕES GERAIS E EPIDEMIOLOGIA

A leishmaniose é uma doença parasitária que acomete cerca de 12 a 15 milhões de indivíduos em todo o mundo, principalmente aqueles residentes em áreas tropicais e subtropicais do planeta. Estima-se que 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente, constituindo assim um crescente problema de saúde pública, acometendo boa parte dos continentes. São doenças transmitidas por insetos vetores, que tem como agente etiológico protozoários do gênero *Leishmania* (Filo Sarcomastigofora, Ordem Kinetoplastidae, Família Tripanosomatidae), sendo em sua maioria zoonoses de animais silvestres (WHO, 2013).

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas pelo parasita protozoário *Leishmania* e mais de 20 espécies são capazes de infectar seres humanos, cada uma causando diferentes espectros de sintomas. Existem três formas principais da doença:

- A Leishmaniose Visceral – também conhecida como calazar, é uma doença sistêmica, podendo acometer vários órgãos, principalmente o fígado, o baço e a medula óssea. Caracteriza-se por acessos irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia. É uma doença de evolução longa, podendo durar alguns meses ou até ultrapassar o período de um ano e se não tratada, pode apresentar ser fatal;
- A Cutânea – é a forma mais comum, caracterizada pela presença de lesões ulceradas na pele, principalmente nas áreas do corpo mais expostas, que apresentam cura espontânea, deixando cicatrizes ao longo da vida e incapacidade grave;
- A Mucocutânea – forma também tegumentar da doença, apresenta lesões que podem destruir parcialmente ou totalmente as mucosas das cavidades da boca, nariz, garganta e tecidos circundantes;
- A forma Cutânea Difusa – forma rara produz lesões cutâneas maculo pápulas nodulares, distribuídas em todo o corpo, que apresentam refratariedade aos tratamentos (WHO, 2013).

Estas protozooses despertam atenção, especialmente quanto a sua importância médica e econômica, encontrando-se a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) entre as seis doenças infecto parasitárias prioritárias no programa de controle conforme a Organização Mundial de Saúde (BRASIL, 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses ocorrem em quatro continentes e são consideradas endêmicas em 98 países e territórios. Estima-se que a LTA atinja cerca de 0.7 a 1.3 milhões de novos casos das diferentes formas clínicas em todo mundo, e que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção por várias espécies do parasito. Aproximadamente 95 % dos casos de LTA ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, Ásia Central e Oriente Médio. Os dez países com as contagens de casos mais estimados são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, e, juntos, representam 70 a 75% da incidência global estimada CL. Já a leishmaniose mucosa tem 90% dos casos concentrados na Bolívia, Brasil e Peru. Nas Américas a LTA está distribuída desde o extremo Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, não havendo relato de casos apenas no Canadá, Chile e Uruguai. No Brasil, a LTA é incluída dentre as grandes endemias, sendo uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem (BRASIL, 2007).

No Brasil, a LTA apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões, com números crescentes nos últimos 20 anos onde as regiões Norte e Nordeste são as mais afetadas, sendo mais frequente em zonas úmidas, ainda que possamos encontrar em ambientes secos e áridos (GONZÁLEZ et al., 2000; GONTIJO & CARVALHO, 2003). A LTA é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas (BRASIL, 2007). A transmissão da doença ocorre no ato da hematofagia pelas fêmeas infectadas de dípteros pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e ao gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo (WHO, 2013). O diagnóstico é feito pela associação dos aspectos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e principalmente a IDRM (MANSON-BAHR, 1987; KAR, 1995). O Ministério da Saúde (MS) registrou surtos epidêmicos nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e recentemente na Amazônia com média anual de 32 mil novos casos de LTA no País, tendo a região Norte notificado aproximadamente 45% destes casos predominando nos estados do Pará, Amazonas e Rondônia; a região Nordeste, 26% dos casos, principalmente no Maranhão, Bahia e Ceará; região Centro-Oeste, 15% com maior número de

casos em Mato Grosso; a região Sul, 3,0% destacando-se o Paraná (GONTIJO & CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007).

O estado da Bahia é o segundo em relatar maior incidência da leishmaniose com número de casos de Leishmaniose Cutânea girando em torno de 23 casos para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2007). E dentre os que se destacam nessa região está o município de Jequié, no qual dos anos de 2001 a 2006, foram atendidos nas unidades de saúde aproximadamente 300 casos de LTA. Notificações no distrito de Florestal, no município de Jequié-Ba, situado na zona de mata Atlântica, com cerca de 6.907 habitantes (IBGE, 2000), mostraram que esta região representa 55,2% dos casos de LTA, representando a maior concentração de casos na região de Jequié, constituindo assim importante área endêmica de Leishmaniose Tegumentar (CERDEPS, 2003).

IV.2. ESPÉCIES, VETORES E FORMAS CLÍNICAS DA LTA

No Brasil já foram identificadas sete espécies de *Leishmania*, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies que causam LTA são; *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*, e, mais recentemente as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V) shawi* identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (SILVEIRA, 2001). Os flebotomíneos são insetos holometábolos completos que pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocerca, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. A subfamília Phlebotominae possui dois gêneros de importância médica, os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, vetores responsáveis pela transmissão das leishmanioses, bartonelose (verruga peruana) e febre papatasi (febre dos três dias), tendo como agentes etiológicos, respectivamente, protozoários, bactérias e arbovírus. As espécies de *Leishmania* transmissoras da LTA pertencem aos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Tabela I).

Tabela 1. Espécies de *Leishmania*, formas clínicas e principais vetores da LTA no Brasil.

Espécies de <i>Leishmania</i>	Forma clínica	Espécies de flebotomíneos
<i>Leishmania braziliensis</i>	LC, LM, 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>

As formas clínicas resultantes da infecção por *L. braziliensis* são distintas, pois depende da interação entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (COUTINHO et al., 1987). A Leishmaniose Cutânea (LC) é caracterizada pela presença de uma lesão eritemato-papulosa, única ou múltipla, evoluindo para pápulo-pustulosa, posteriormente úlcero-crostosa de contorno circulares, bordas infiltradas, em moldura, indolor e fundo granuloso (BARRAL

et al., 1995; BRASIL, 2007). A Leishmaniose Mucosa (LM) é definida por lesões que atingem a mucosa nasal podendo também envolver boca, laringe e faringe, apresentando aspectos de cronicidade, latência e por desenvolver metástases em mucosas que conduzem a quadros clínicos desfigurantes (RIBEIRO & LOPES-FILHO, 1994; MARSDEN et al., 1994). A Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCD) caracteriza-se pelo aparecimento de dez ou mais lesões papulares, e de aparência acneiformes e ulceradas que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco (TURETZ et al., 2002). A Leishmaniose Recidiva Cutis (LRC) que é caracterizada por presença de lesões nodulares em torno ou no interior da cicatriz de uma prévia lesão por *Leishmania sp.*, de aparecimento tardio e de longa duração (BITTENCOURT et al., 1993).

IV.3. MECANISMOS DE TRANSMISSÃO DA LTA

A transmissão da *Leishmania* ocorre a partir da picada de seu inseto vetor, os flebotomíneos. Apenas as fêmeas dos flebotomíneos são hematófagas. Estas estão aptas a hematofagia no primeiro dia de vida, porém normalmente realizam após o segundo dia, tempo em que as suas peças bucais já se encontram rígidas e as glândulas salivares amadurecidas (VOLF et al., 2000; PRATES et al., 2008). O ciclo de vida da *Leishmania* se inicia quando uma fêmea ingere formas amastigotas do parasito durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado. Após a picada, as amastigotas são ingeridas juntamente com sangue, livres ou dentro das células hospedeiras, os macrófagos e dentro do intestino do inseto vetor o parasito se multiplica e se desenvolve em promastigotas metacíclicas, forma infectiva para os hospedeiros vertebrados. A transmissão do parasito ocorre quando o flebotomíneo infectado faz um segundo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado. Neste momento as metacíclicas são inoculadas na pele do vertebrado juntamente com a saliva (KAYE & SCOTT 2011) (Figura I).

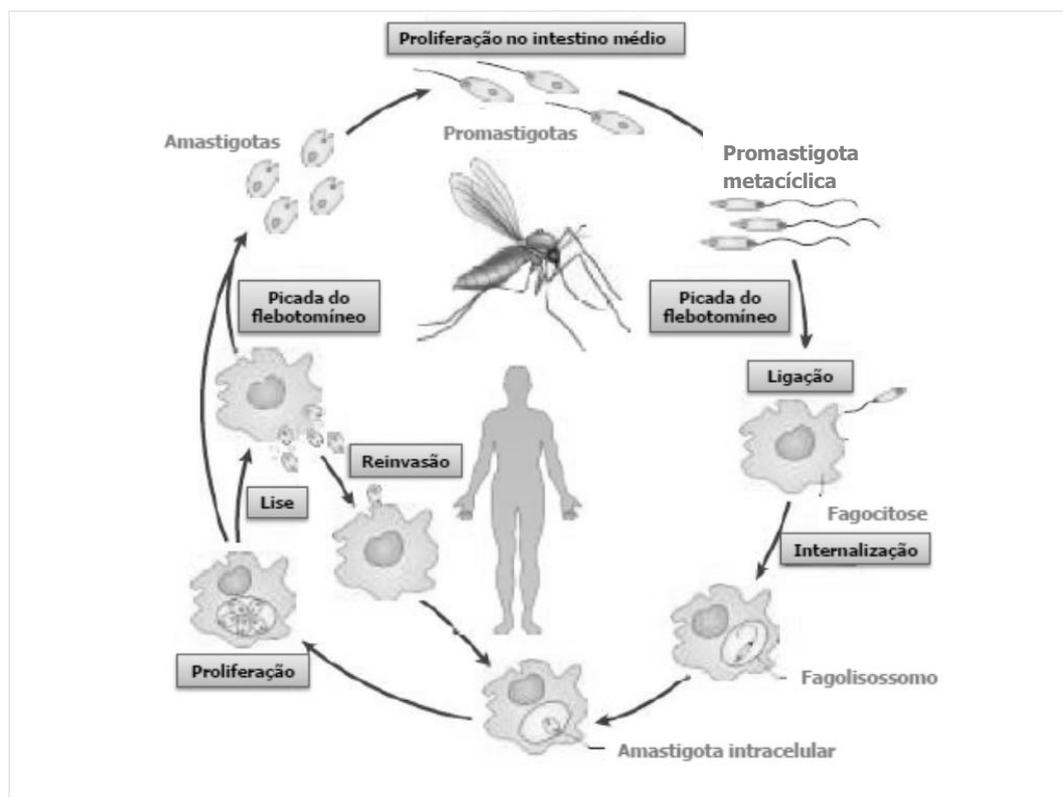


Figura 1. Ciclo de vida da *Leishmania*, mostrando a fase do ciclo no hospedeiro invertebrado (flebotomíneo) e vertebrado (mamífero). Adaptado de KAYE & SCOTT, 2011.

IV.4. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

Após a inoculação do parasito, a infecção por *L. braziliensis* pode levar a uma resposta imunológica específica por parte do hospedeiro, caracterizada pelo aumento de células T CD4+ e um perfil de citocinas Th1, e no caso da Leishmaniose Cutânea, a resposta imune celular é caracterizada por apresentar altos níveis na produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , CXCL9 e baixos níveis de citocinas reguladoras como IL-10 e IL-5 (CARVALHO et al., 2012). Paralelamente a essa resposta, a sobrevivência da *Leishmania* depende da evasão do sistema imune do hospedeiro, sendo que este parasito é altamente adaptado ao escape da resposta imune humoral e celular desenvolvida pelo hospedeiro (SACKS & SHER, 2002; ZAMBRANI-VILLA et al., 2002).

O controle da infecção pela *Leishmania* no meio intracelular faz com que este seja dependente da resposta imune mediada por células, pois o macrófago é a principal célula efetora da eliminação das amastigotas, após sua ativação pelos linfócitos T auxiliares (*helper*). Para que esta replicação parasitária não ocorra, é necessária predominância da resposta imune celular do tipo Th1, envolvendo linfócitos CD4 e CD8 e citocinas como IFN- γ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-2, síntese de derivados de N₂, a exemplo do óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (SCOTT et al., 1989, MACHADO et al., 2004). Todavia, uma forte resposta destas citocinas secretadas pelo linfócito T pode levar a uma reação inflamatória intensa e causar dano tecidual, resultando no aparecimento de úlceras na pele e mucosa (BACELLAR et al., 2002), podendo estar associado com vários fatores como infiltrado de macrófagos e linfócitos e com pouca presença de parasitas (BITTENCOURT et al., 1991) e maior produção de NO e TNF, tamanho da lesão e a extensão do infiltrado inflamatório (OLIVEIRA et al., 2011). Dessa forma, uma atuação equilibrada do sistema imunológico é muito importante para que o parasito não cause danos, fazendo com que embora permaneça presente, o agente infectante não cause doença (MACHADO et al., 2004).

Adicionalmente, diversos estudos apontam que em áreas de transmissão de *L. braziliensis* cerca de 10-20% dos indivíduos sem história de LTA e sem cicatrizes compatíveis residentes em área endêmica apresentam intradermoreação de Montenegro a antígeno de *Leishmania* positivo, caracterizando uma forma subclínica da Leishmaniose (FOLLADOR et al., 2002). A resposta imune nesses indivíduos assintomáticos com uma IDR positiva é caracterizada por controlar a replicação parasitária e impedir que ocorra o

dano tecidual, que pode ser explicada por estes indivíduos apresentarem uma resposta moderada e modulada, com presença de menores níveis de IFN- γ e de TNF- α e maior produção de IL-10 quando comparados com pacientes com LC (FOLLADOR et al., 2002). Ou mesmo controlar a infecção através da resposta inata, na qual foi documentado por Giudice et al. (2012) que macrófagos de indivíduos subclínicos eliminam a *L. braziliensis* de maneira mais eficiente do que macrófagos de pacientes com LC. A manutenção da imunidade a longo tempo específica a *Leishmania* nos indivíduos assintomáticos reforça a ideia que o estímulo frequente ao parasito pode conferir proteção contra reativação ou reinfeção a *Leishmania* (BITTAR et al., 2007).

Em relação à resposta imune humoral da Leishmaniose, testes sorológicos como o ensaio imunoenzimático ligado à enzima (ELISA), têm sido de grande importância no diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos, pois além de analisar a presença de anticorpos anti *Leishmania*, estes testes permitem avaliar o curso evolutivo da infecção e auxiliar na compreensão dos mecanismos de controle do sistema imune sobre os parasitas (TRUJILLO et al., 1999). O ELISA tem sido o método sorológico mais utilizado para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral, pois é fácil de executar e tem um custo baixo, além de ser realizado em laboratórios de nível intermediário utilizando um equipamento relativamente simples (SOUZA et al., 2013). Porém, os anticorpos parecem não ter um papel protetor na LTA (DE SOUZA et al., 2005). Os testes sorológicos como o ELISA e a imunofluorescência (IF) na LTA são utilizados como ferramentas complementares ao diagnóstico, realizado através da IDRM e histopatologia da lesão, pois apresentam pouca especificidade (GOTO & LINDOSO, 2010).

V. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

V.1. DESENHO DE ESTUDO

O estudo foi realizado no distrito de Florestal pertencente ao município de Jequié-Ba, situado na zona de mata Atlântica, numa região que vem sofrendo desmatamento intenso nos últimos 15 anos, que permite visualizar a floresta tropical primária somente em poucas áreas próximas as serras. A população do distrito de Florestal é constituída em sua maioria de descendentes de africanos, mas também de brancos e indígenas. De acordo com o censo do IBGE em 2000, o distrito possuía cerca de 6.907 habitantes, densidade demográfica de 32,9 hab/km², sendo que 88,5% da população reside na área rural (dados da Prefeitura Municipal de Jequié, 2005). Dos anos de 2001 a 2006, foram atendidos nas unidades de saúde do município de Jequié aproximadamente 300 casos de LTA. As notificações mostraram que o distrito de Florestal com 55,2% dos casos de LT representa a maior concentração de casos no Município, constituindo assim área endêmica importante de Leishmaniose Tegumentar, segundo dados do CERDEPS/SESAB.

Em 2006, Dr. Jackson Costa e equipe iniciou um projeto para estudar vários aspectos da LTA em Florestal, desde quando este é o foco mais importante de LTA no município de Jequié. O estudo foi desenhado para acompanhar indivíduos identificados através de um censo e seguido de dois inquéritos (2006 e 2011). Na fase inicial do estudo em 2006, foram coletados soros de 343 indivíduos e destes, 215 foram realizados intradermorreação de Montenegro (IDRM). Na segunda fase do estudo realizada em 2011, na mesma comunidade, foram obtidos amostras de soros de 214 indivíduos e realizado IDRM de 195, com uma perda de 129 indivíduos na coleta de soro e 20 indivíduos na IDRM. Neste momento, logo após a leitura da IDRM, foram selecionados por conveniência e coletados amostras de sangue de 47 indivíduos, distribuídos em 4 grupos: Grupo I com 11 indivíduos que tiveram doença anteriormente (LC+) e apresentaram IDRM positiva (IDRM+) no ano de 2006 e IDRM+ no ano de 2011; Grupo II por indivíduos que não relataram ou tiveram evidência, cicatriz e doença no passado (LC-) mas apresentavam IDRM+ em 2006 e 2011 (n=10); Grupo III foi composto por 12 indivíduos LC- e com IDRM negativa (-) no ano de 2006 e IDRM+ em 2011 e o Grupo IV foram 14 indivíduos LC- com IDRM- em 2006 e IDRM- em 2011, como demonstrado no quadro abaixo (Quadro 1).

Quadro 1. Distribuição dos grupos de indivíduos da população do estudo da área endêmica para LTA conforme a história prévia da doença e resposta da IDRM.

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
CL + 2006 IDRM + 2011 IDRM +	CL - 2006 IDRM + 2011 IDRM +	CL - 2006 IDRM - 2011 IDRM +	CL - 2006 IDRM - 2011 IDRM -
11 indivíduos	10 indivíduos	12 indivíduos	14 indivíduos

CL + → antecedentes médicos de leishmaniose cutânea
IDRM + → teste de Montenegro positivo

CL - → sem antecedentes médicos de leishmaniose
IDRM - → teste de Montenegro negativo

Antes de iniciar o inquérito, a equipe formada por médicos, enfermeiras e agentes de saúde, foram treinados e orientados anteriormente para a realização da coleta de sangue e aplicação da intradermorreação de Montenegro e sua leitura, realizados na residência dos indivíduos com a devida autorização, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (ANEXO 1).

V.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo indivíduos maiores de cinco anos de idade, sem LC ativa, ausência de lesões ulceradas típicas e que concordaram em assinar o TCLE para coleta do sangue e aplicação da IDRM.

V.3. CRITÉRIOS DE NÃO-INCLUSÃO

No estudo não foram incluídos indivíduos que não concordaram em participar, se recusaram a assinar o TCLE, presença de lesões ulceradas típicas e que pediram para ser retirado do estudo em qualquer momento da realização do mesmo.

V.4. COLETA DE SANGUE

Foram coletadas alíquotas de 10 ml de sangue periférico em tubo heparinizado no domicílio do indivíduo. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente no tubo devidamente identificado dentro de isopor até serem encaminhadas e recebidas no mesmo dia no Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz – Ba (CPqGM-FIOCRUZ) para serem processadas.

V.5. INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO (IDRM)

A intradermorreação de Montenegro foi realizada em todos os indivíduos com leitura em milímetros utilizando régua milimetrada, 48 a 72 horas após a inoculação intradérmica com seringa do tipo tuberculina de 0,1ml do antígeno solúvel de *Leishmania* (250µg/ml), na face anterior do antebraço direito. A interpretação baseou-se na área de induração apresentada, sendo adotados os seguintes valores de referência: <25mm² (= negativo), >25mm² (= positivo) (MAYRINK et al., 1993). O antígeno utilizado foi proveniente do Fundep/UFMG/BH/MG.

V.6. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE *LEISHMANIA*

Para obtenção do antígeno solúvel parasitário, a cepa de *L. braziliensis* (MCAN/BR/00/BA788) foi mantida em meio de cultura Schneider (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 100 U/ml de penicilina e 100 ug/ml de estreptomicina (Gibco). Para a aquisição do antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) os parasitos foram inicialmente submetidos a 10 ciclos alternados de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e banho-Maria e posteriormente centrifugados (1600xg, 4°C, 15'). O sobrenadante contendo o SLA foi coletado, filtrado (0.22µm) em fluxo laminar e quantificado através do Micro BCA TM Protein assay Reagent Kit (Pearce).

V.7. CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRIO - OBTENÇÃO, ESTÍMULO E CULTURA

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas de 10 mL de sangue venoso periférico heparinizado, diluído 1/2 em salina e centrifugado a 1500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente em gradiente Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O soro foi coletado e armazenado a -20°C. 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 $1,5 \times 10^6$ células/mL em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado com 1% de 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 de 48 poços (Costar; Corning, NY) e estimuladas *in vitro* com SLA de *L. braziliensis* (10µg/mL) por 72 horas à 37°C. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 1100 rotações por minuto (rpm), a 25°C por 5 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C e às células foi adicionado 500µl de trizol e armazenadas no -70°C.

V.8. DOSAGEM DE CITOCINAS

As citocinas IL-2, IL-10, TNF- α e IFN- γ foram dosadas no sobrenadante dos pacientes através do Kit Cytometric Bead Array - CBA (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) e avaliadas através do método de *Cytometric bead array* (CBA). O Kit possui beads de captura específica (FL3) para cada citocina de interesse, que são esferas ligadas a um anticorpo específico com intensidades de fluorescência distintas, e um anticorpo de detecção conjugado a ficoeritrina (PE - FL2). Os anticorpos proporcionam um sinal fluorescente proporcional com a quantidade de citocinas capturadas. Uma curva padrão para cada citocina é utilizada como referência de concentrações conhecidas, e abrange um conjunto definido de concentrações de 20 a 5.000 pg/mL.

Na construção da curva padrão fez-se uma diluição seriada. Para isso utilizamos um tubo falcom de 15mL (Top Standert), ao qual transferimos as esferas do Standert e acrescentamos 2 mL do Assay Diluent, incubamos por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram identificados oito ependorffs (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:264), nos quais

foram acrescentados 300 μL do assay diluente para a realização da diluição seriada. Após a diluição seriada acrescentamos 25 μL em cada poço da placa (96 poços, fundo U) de aquisição identificado (Quadro 2).

Quadro 2. Diluição seriada da curva padrão do Kit Cytometric Bead Array (CBA) para dosagem de citocinas.

Tube label	Concentration (pg/mL)	Standard dilution
1	0 (negative control)	no standard dilution (Assay Diluent only)
2	20	1:256
3	40	1:128
4	80	1:64
5	156	1:32
6	312.5	1:16
7	625	1:8
8	1,250	1:4
9	2,500	1:2
10	5,000	Top Standard

As amostras de sobrenadante foram diluídas 1:5 e distribuídas nos poços, seguintes aos da curva padrão, na concentração de 25 μL .

Para a realização da dosagem as amostras de sobrenadante e os padrões foram incubados com as beads e o PE por três horas. Para a distribuição das beads foi feito um mix, constituído por uma alíquota de 5 μL de cada bead de captura para cada poço de ensaio a ser analisado, incluído os padrões.

Seguindo a distribuição do mix de beads adicionamos 25 μL do PE (anticorpo de detecção) a cada poço e incubamos por três horas na geladeira e protegido da luz. Após a incubação foi feita a lavagem com 200 μL com o tampão de lavagem (centrifugação refrigerada, 1500 rpm, 10min), em seguida descartamos o sobrenadante vagarosamente e ressuspendemos as amostras e padrões com 200 μL com o tampão de lavagem.

Os dados foram adquiridos por citometria de fluxo (BD FACSAArray) e a análise realizada pelo Software FCAP Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) considerando uma curva padrão (pg/mL).

V.9. REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI *LEISHMANIA*

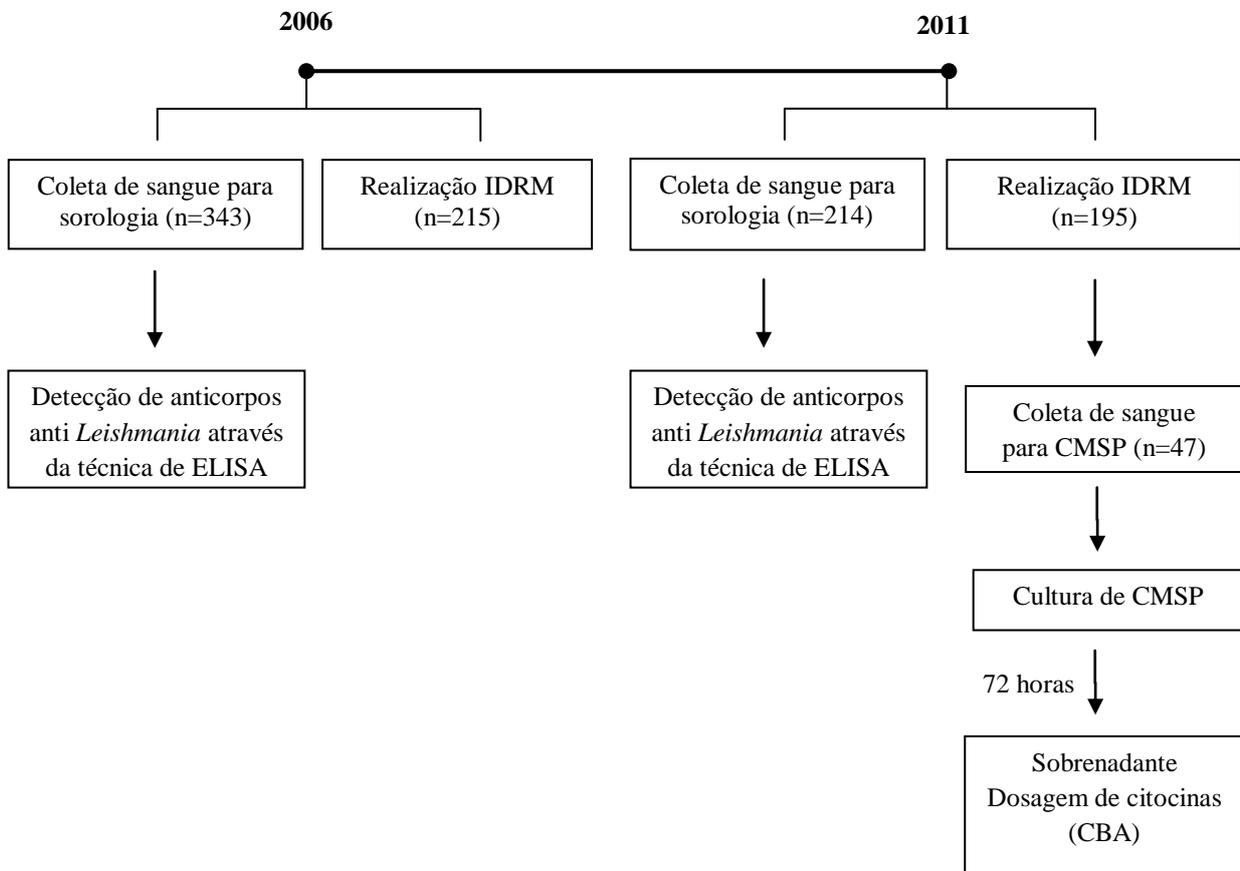
As sorologias anti *Leishmania* foram realizadas através da reação imunoenzimática (ELISA) conforme descrito por BARRAL et al. (2000), com algumas adaptações. Para isso, placas de 96 poços (Linbro/Titertek), foram sensibilizadas com SLA de *L. braziliensis* (10 ug/ml) em tampão carbonato (NaHCO_3 0,45M, Na_2CO_3 0,02 M, pH 9,6) durante a noite a 4°C. Depois de três lavagens com PBS-Tween 0,05%, as placas foram bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente com PBS Tween 0,05% mais 1% de soro bovino fetal (BSA). Os soros foram diluídos 1:100 com PBS-Tween 0,05% mais 0,25% de BSA e incubadas por 1 horas a 37°C. Após uma última série de lavagens, os poços foram incubados com anti-IgG humano conjugado a fosfatase alcalina (Sigma, Sr. Louis, MO) na diluição 1:2500 em PBS-Tween 0,05% mais 0,25% de BSA por 1 hora a 37°C. Novamente as placas foram lavadas, e colocadas para revelar por 30 minutos com uma solução cromogênica de p-nitrofenilfosfato em tampão carbonato de sódio pH 9.6 com 1mg/mL de MgCl_2 . A reação foi interrompida com 50µL/poço de NaOH 3M, 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). A concentração do antígeno bruto utilizada foi determinada em um experimento de dose-resposta para avaliar um sinal ótimo sem perder a especificidade (dados não mostrados). Em todos os experimentos, os valores obtidos foram subtraídos dos obtidos no *background*. O ponto de corte (*cut off*) do ELISA anti-IgG total de *Leishmania* foi estabelecido através do cálculo da média mais três vezes o desvios-padrão da densidade ótica (DO) das amostras de soro de 26 indivíduos de uma área urbana não-endêmica. As amostras de soro do ano de 2006 e 2011 com DO acima do *cut off* 0.050 e 0.062, respectivamente, foram consideradas positivas para *Leishmania*.

V.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad software Prisma 5.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). Para análise estatística foram usados testes não paramétricos. O teste Kruskal-wallis foi utilizado para comparação entre três ou mais medias, com pós-teste de Dunn e as correlações pelo método de Spearman. Os valores do *cut off* foram estabelecidos através da média mais três desvios-padrão da densidade ótica (DO). Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

V.11. ASPÉCTOS ÉTICOS

O trabalho foi desenvolvido sob os critérios da Regulamentação da Bioética no Brasil, Resolução 196/96 de 10 de Outubro de 1996 e resoluções complementares do Conselho Nacional de Saúde, que determina as diretrizes a serem adotadas nas pesquisas que envolvem seres humanos, atendendo desta forma às exigências éticas e científicas fundamentais tendo aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (parecer nº 79/2005 – CEP/CPqGM/FIOCRUZ) (ANEXO 2) e todos indivíduos ou familiares responsáveis pelos menores assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1).

V.12. DESENHO EXPERIMENTAL

VI. RESULTADOS

VI.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

No inquérito de 2006, foi coletado sangue de 343 indivíduos e realizadas sorologias anti *Leishmania* e 215 fizeram testes intradérmicos de Montenegro. No inquérito realizado em 2011 foram coletadas 214 amostras para sorologia e realizadas IDRMs em 195 indivíduos. Na amostra estudada em 2006, do total de 28 indivíduos LC+, 26 (92,8%) apresentaram IDRMs positivas e dos 187 indivíduos LC-, 36 (19,25%) foram positivos na IDRMs. Em relação à sorologia, 41 do total de indivíduos LC+, 27 (65,8%) foram positivas e dos 302 indivíduos LC-, 67 (22,2%) apresentaram positividade na sorologia.

Durante o inquérito de 2011, 20 indivíduos tinham histórico de LC, sendo 19 (95%) IDRMs positivas. Entretanto, dos indivíduos LC- (n=175), 58 (33,1%) foram positivos para o IDRMs. No que se refere à sorologia anti *Leishmania*, dos 21 indivíduos LC+, 8 (38,1%) foram positivos e dos 193 LC-, 38 (19,7%) foram ELISA positivo (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados de IDRMs e sorologia nos indivíduos envolvidos nos inquéritos de 2006 e 2011, na área rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia.

	LC+		LC-	
	2006	2011	2006	2011
IDRM +	26/28 (92,8%)	19/20 (95%)	36/187 (19,25%)	58/175 (33,1%)
SOROLOGIA +	27/41 (65,8%)	8/21 (38,1%)	67/302 (22,2%)	38/193 (19,7%)

Com a finalidade de avaliar os indivíduos LC+ e LC- que fizeram IDRMs em 2006 e repetiram o teste no inquérito de 2011, verificamos que dos 28 indivíduos com LC+, 26 (92,8%) apresentaram IDRMs+, destes 12 indivíduos foram reavaliados quanto a IDRMs em 2011 e todos mantiveram a IDRMs positiva. Foi feita a mesma avaliação nos indivíduos LC- e

constatamos que dos 36 (19,3%) positivos, 18 foram reavaliados em 2011 e 12 (66,6%) continuaram com a IDR+ (Quadro 3).

Quadro 3. IDR nos indivíduos participantes do inquérito de 2006, com ou sem histórico de Leishmaniose Cutânea, que foram positivos e realizaram a IDR no ano de 2011.

	LC+		LC-	
	IDRM-	IDRM+	IDRM-	IDRM+
2006	2	26	151	36
2011	↓		↓	
	12		18	
	↙ ↘		↙ ↘	
	IDRM-	IDRM+	IDRM-	IDRM+
	0	12	6	12

Em relação aos indivíduos LC+ e LC- que fizeram sorologia em 2006 e foram repetidos no inquérito de 2011, dos 41 indivíduos LC+, 27 (65,8%) apresentaram sorologia positiva, sendo que destes, 15 foram submetidos ao teste novamente em 2011 e 8 (53,4%) permaneceram positivos. Enquanto nos indivíduos LC- (n=302), 67 (22,2%) mostraram-se positivos na sorologia anti *Leishmania*, e destes, 32 indivíduos foram reavaliados em 2011, e 13 (40,6%) foram positivos (Quadro 4).

Quadro 4. Sorologia nos indivíduos participantes do inquérito de 2006, com ou sem histórico de Leishmaniose Cutânea, que foram positivos e realizaram a IDRMM no ano de 2011.

	LC+		LC-	
	SORO-	SORO+	SORO-	SORO+
2006	14	27	151	36
2011		15		18
		SORO- SORO+		SORO- SORO+
		7 8		6 12

VI.2. DADOS DEMOGRÁFICOS DOS 47 INDIVÍDUOS PARTICIPANTES DO ESTUDO IMUNOLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS

Após analisarmos os dados epidemiológicos dos inquéritos realizados no ano de 2006 e 2011 com o intuito de entender melhor a população avaliada, partimos para análise dos dados demográficos da população do estudo e a área da intradermoreação de Montenegro entre os diferentes grupos de indivíduos. A população do estudo foi composta por 47 indivíduos selecionados a partir dos inquéritos de 2006 e 2011, distribuídos em 4 grupos diferentes. O grupo 1 apresentou faixa etária de 18 a 74 anos e 54,5% eram do sexo masculino, os indivíduos do grupo 2 apresentaram idades de 35 a 87 anos e 90% eram do sexo masculino, a faixa etária do grupo 3 foi de 7 a 54 anos e a maioria (58,4%) pertenciam ao sexo masculino e o grupo 4 apresentou indivíduos de 6 a 53 anos de idade e 50% eram do sexo feminino (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos 47 indivíduos em relação às variáveis grupo, idade e sexo da comunidade rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia.

Identificação	Grupo	Idade	Sexo
1	1	53	M
2	1	18	M
3	1	19	M
4	1	26	F
5	1	45	F
6	1	74	F
7	1	53	M
8	1	36	M
9	1	55	F
10	1	57	F
11	1	60	F
12	2	79	M
13	2	68	F
14	2	87	M
15	2	63	M
16	2	73	M
17	2	48	M
18	2	65	M
19	2	35	M
20	2	41	M
21	2	69	M
22	3	52	F
23	3	46	M
24	3	37	M

25	3	30	F
26	3	13	F
27	3	22	M
28	3	28	F
29	3	46	F
30	3	54	M
31	3	13	M
32	3	12	M
33	3	7	M
34	4	10	M
35	4	29	F
36	4	21	M
37	4	20	F
38	4	6	F
39	4	13	F
40	4	13	F
41	4	26	M
42	4	52	F
43	4	16	M
44	4	25	M
45	4	53	M
46	4	47	F
47	4	23	M

A idade média dos indivíduos avaliados foi de 34,1 anos, faixa etária de 6 a 87 anos, sendo que 29 (61,7%) pertencem ao sexo masculino e 18 (38,3%) ao sexo feminino (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência das variáveis sexo e idade dos 47 indivíduos da comunidade rural de Florestal, Município de Jequié, Bahia.

Características	Frequência absoluta	Frequência relativa
Sexo		
Masculino	29	61,7
Feminino	18	38,3
Idade (anos)		
6 a 25	16	34
25 a 50	14	29,8
51 a 75	15	31,9
75 a 87	2	4,3

VI.3. IDRM DOS GRUPOS ESTUDADOS

Para avaliar a resposta imune específica, realizou-se o teste *in vivo*, a IDRM. O grupo de indivíduos curados apresentou uma média (\bar{x} = 301,3 mm²) maior de IDRM quando comparados com os demais grupos, porém não foi estatisticamente significativa. Os indivíduos LC- e IDRM+ tanto em 2006 quanto em 2011 apresentaram uma \bar{x} = 250,6 mm² e a média das IDRM do grupo LC-, IDRM- e que positivou a IDRM em 2011 foi igual a 81,00 mm² (Figura 2).

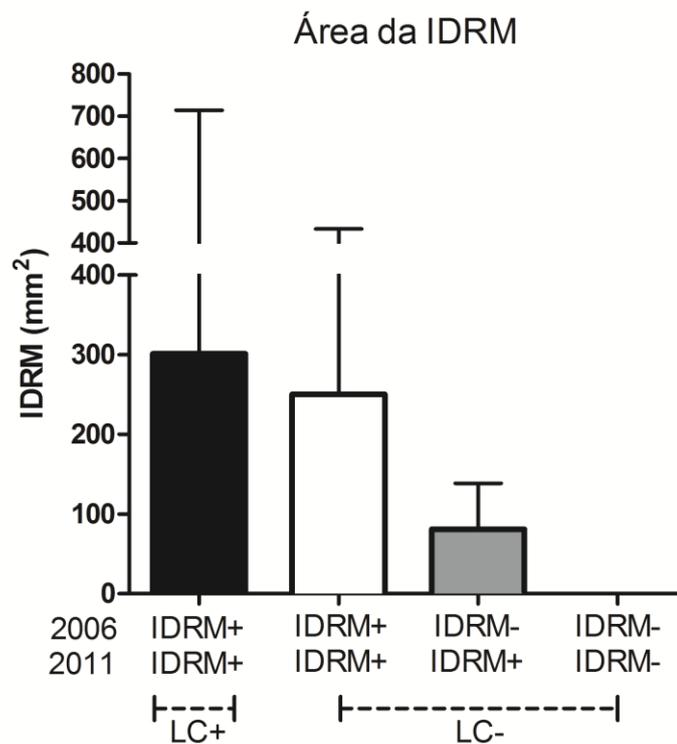


Figura 2. Área da IDRM dos indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea. A intradermorreação de Montenegro foi realizada nos indivíduos com leitura em milímetros utilizando régua milimetrada, 48 a 72 horas após a inoculação intradérmica do antígeno solúvel de *L.braziliensis*. A interpretação baseou-se na área de induração apresentada, sendo adotados os seguintes valores de referência: <25mm² (= negativo), >25mm² (= positivo).

VI.4. PERFIL DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

A avaliação da resposta imune celular *in vitro* dos indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea foi determinado através de ensaio de citometria de fluxo (CBA). As células dos indivíduos estimulados com SLA de *L. braziliensis* dos grupos com LC+ e LC- com IDR+ em 2006 e 2011 produziram concentrações significativamente maiores de IFN- γ do que indivíduos sem estímulo (MEIO) ($p < 0.001$) (Figura 3A).

Ao compararmos a produção de IFN- γ nos diferentes grupos, verificamos a diferença do grupo LC+, IDR+ em 2006 e 2011 (mediana igual a 13027 pg/mL) e do grupo assintomático com IDR+ tanto em 2006 quanto em 2011 (mediana= 9498 pg/mL), entre os indivíduos LC- que converte a IDR somente em 2011 (mediana= 26,92 pg/mL), assim também com os indivíduos LC-, IDR- em 2006 e que não positivaram a reação em 2011 (mediana= 10,40pg/mL) ($p < 0.001$) (Figura 3B).

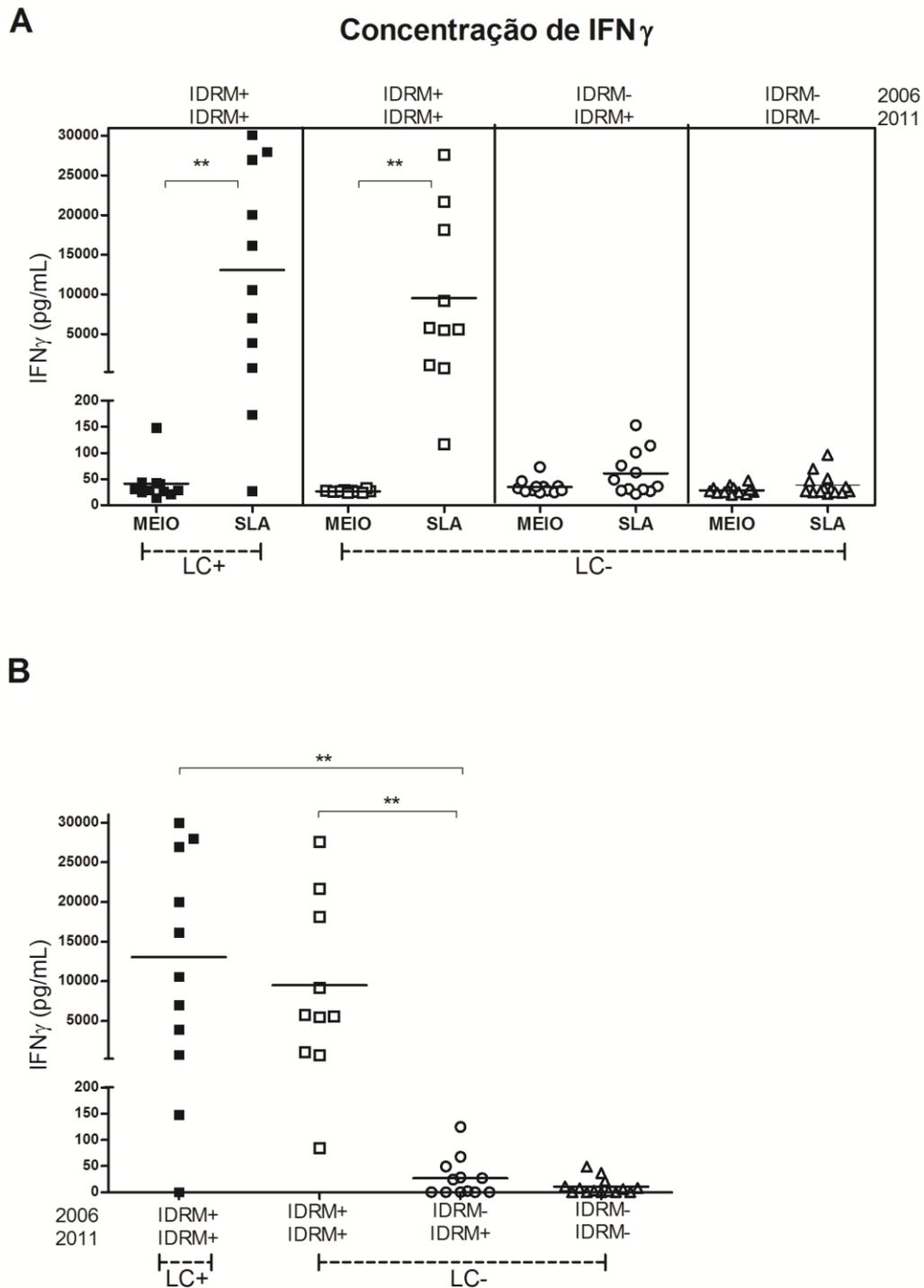


Figura 3. Concentração de citocina IFN- γ nos sobrenadantes de culturas de células de indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea (LC). CMSP de indivíduos na presença (LC+) ou ausência (LC-) de histórico de LC foram cultivadas com SLA de *L. braziliensis* por 72 horas e a concentração da citocina IFN- γ foi determinada por citometria de fluxo (CBA). (A) Comparação dentro dos grupos: ausência SLA de *L. braziliensis* (MEIO) e SLA. (B) Comparação entre os grupos estimulados com SLA. Os valores estão apresentados por diferentes grupos e as barras horizontais representam as medianas. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis. **p<0.001.

A produção de TNF- α (Figura 4) nas células dos indivíduos estimulados com SLA de *L. braziliensis* apresentou diferença entre os grupos LC+ e LC- com IDRM+ em 2006 e 2011 (mediana= 430,7pg/mL e 277,37pg/mL respectivamente) com os grupos LC-, IDRM- em 2006 e IDRM+ em 2011 (mediana= 4,11pg/mL) e LC-, IDRM- em 2006 e 2011 (mediana= 1,22pg/mL), significativamente semelhante ao encontrado na produção de IFN- γ ($p < 0.05$ e $p < 0.0001$).

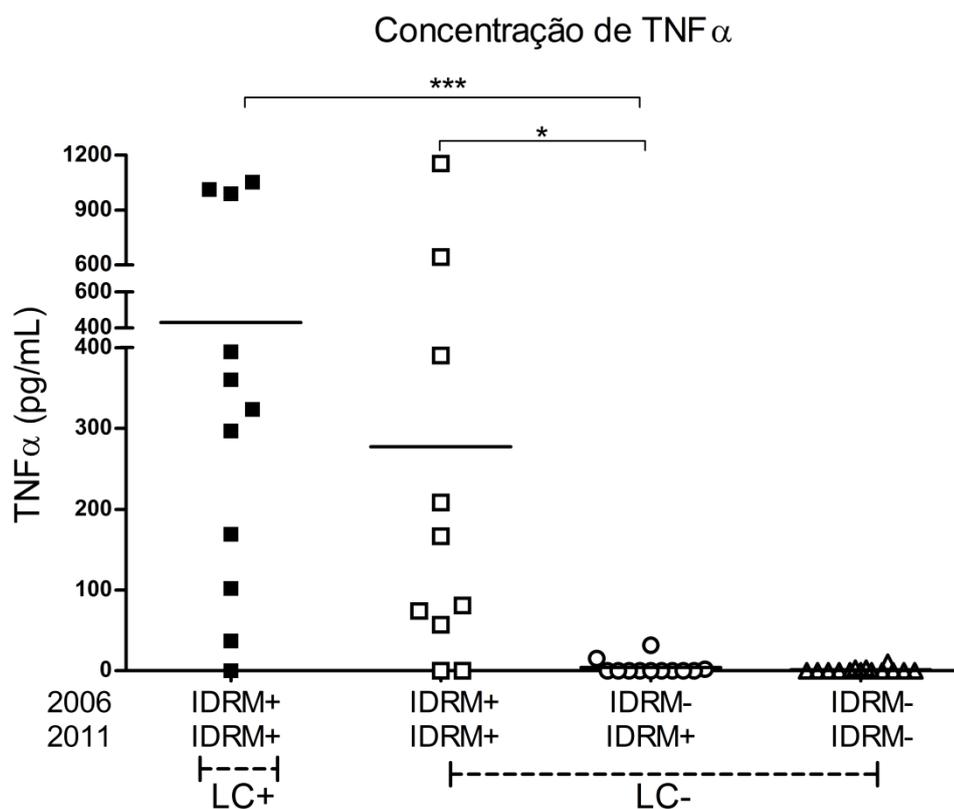


Figura 4. Produção de TNF α nos sobrenadantes de culturas de células de indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea (LC). CMSP de indivíduos na presença (LC+) ou ausência (LC-) de histórico de LC foram cultivadas com SLA de *L. braziliensis* por 72 horas e a concentração da citocina TNF α foi determinada por citometria de fluxo (CBA) e os resultados são expressos como pg/ml. Os valores estão apresentados individualmente e as barras horizontais representam as medianas. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$.

Em relação à concentração de IL-2 (Figura 5) nas células dos indivíduos estimulados com SLA de *L. braziliensis*, a produção desta citocina foi significativa entre os grupos LC+ IDR+ em 2006 e 2011 (mediana= 605,0pg/mL) e LC-, IDR- e IDR+ (mediana= 2,05pg/mL) ou IDR- (mediana= 2,31pg/mL) ($p<0.0001$), e também entre os grupos LC- e IDR+ em 2006 e 2011 (mediana= 542,6pg/mL), com os demais grupos LC-, IDR- em 2006 e IDR positivo ou negativo em 2011 ($p<0.05$), assim como encontrado na produção de TNF- α e IFN- γ .

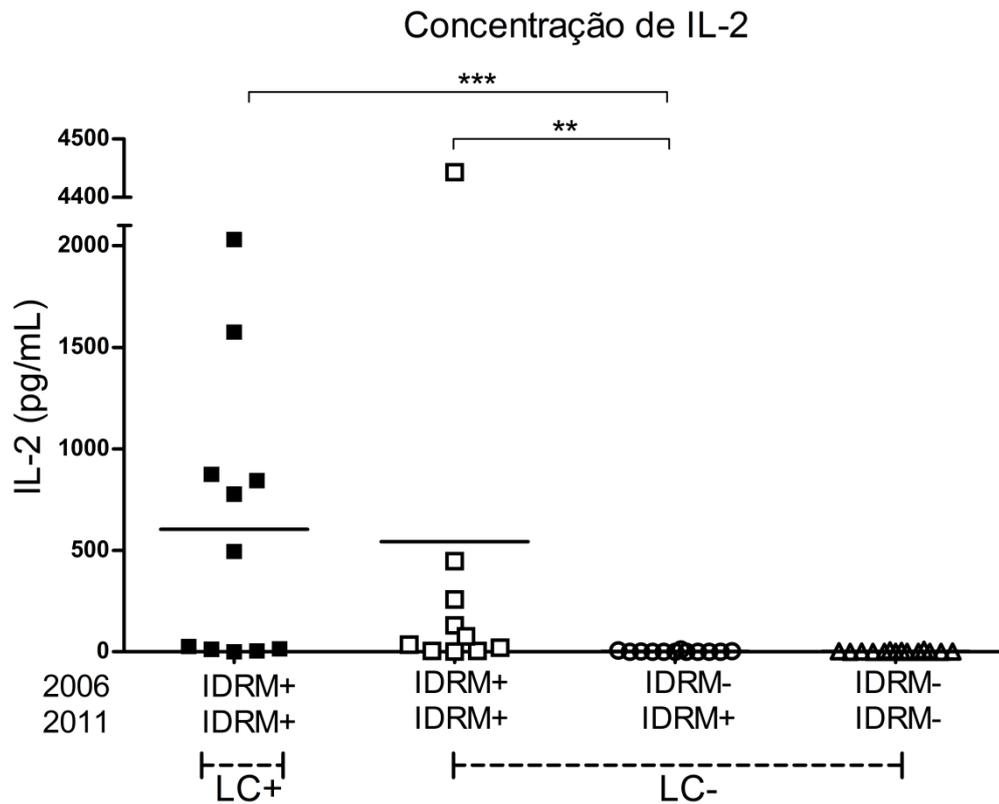


Figura 5. Produção de IL-2 nos sobrenadantes de culturas de células de indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea (LC). CMSP de indivíduos na presença (LC+) ou ausência (LC-) de histórico de LC foram cultivadas com SLA de *L. braziliensis* por 72 horas e a concentração da citocina IL-2 foi determinada por citometria de fluxo (CBA) e os resultados são expressos como pg/ml. Os valores estão apresentados individualmente e as barras horizontais representam as medianas. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis. ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$.

A citocina IL-10 não apresentou produção estatisticamente significativa entre os grupos curados, assintomáticos e negativos (mediana= 4,21pg/mL) (Figura 6). A mediana da produção desta citocina no grupo LC+, IDRM+ em 2006 e 2011 foi de 46,74pg/mL, nos indivíduos LC-, IDRM+ em ambos os anos foi 23,18pg/mL, enquanto que nos LC-, IDRM- em 2006 e IDRM+ em 2011 a mediana foi igual a 1,99pg/mL.

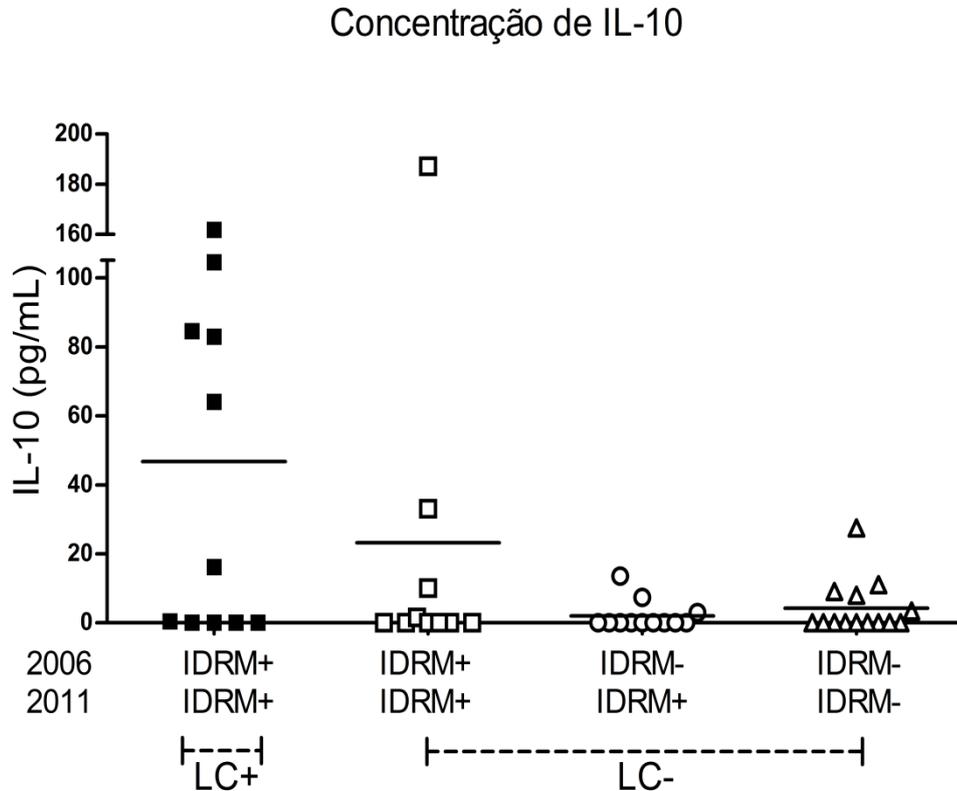


Figura 6. Produção de IL-10 nos sobrenadantes de culturas de células de indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea (LC). CMSP de indivíduos na presença (LC+) ou ausência (LC-) de histórico de LC foram cultivadas com SLA de *L. braziliensis* por 72 horas e a concentração da citocina IL-10 foi determinada por citometria de fluxo (CBA) e os resultados são expressos como pg/ml. Os valores estão apresentados individualmente e as barras horizontais representam as medianas. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

VI.5. CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS E INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO

Após avaliação do perfil de citocinas dos indivíduos nos diferentes grupos, partimos para correlacioná-los com a intradermorreação de Montenegro. A partir da análise pelo teste de Correlação de Spearman, verificou-se uma correlação positiva entre a produção de IFN- γ ao antígeno solúvel de *Leishmania* e IDRMM dos 47 indivíduos, sendo estatisticamente significativa ($r = 0,5258/ p= 0,0002$) (Figura 7).

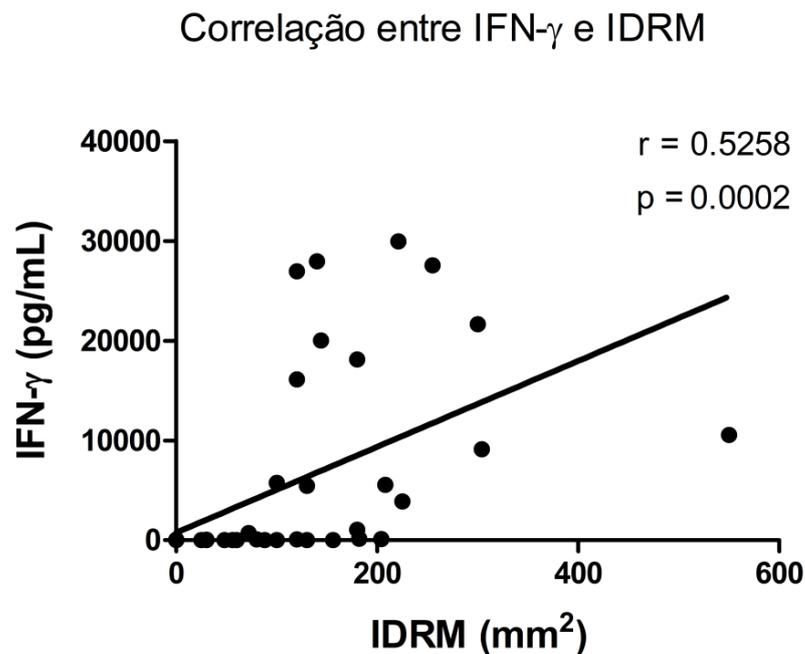


Figura 7. Correlação entre a produção de IFN- γ ao antígeno solúvel de *Leishmania* e IDRMM. Os dados foram obtidos a partir dos valores de IFN- γ (pg/mL) e IDRMM (mm²) de 47 indivíduos de área endêmica para LC. Estes dados foram analisados pelo teste de Correlação de Spearman. $p= 0,0002$, $r = 0,5258$.

Ao verificarmos a correlação entre a produção de TNF- α após estimulação das CMSP com SLA e a IDRМ da população do estudo, esta se apresentou positiva ($r = 0,5028/ p= 0,0003$) (Figura 8).

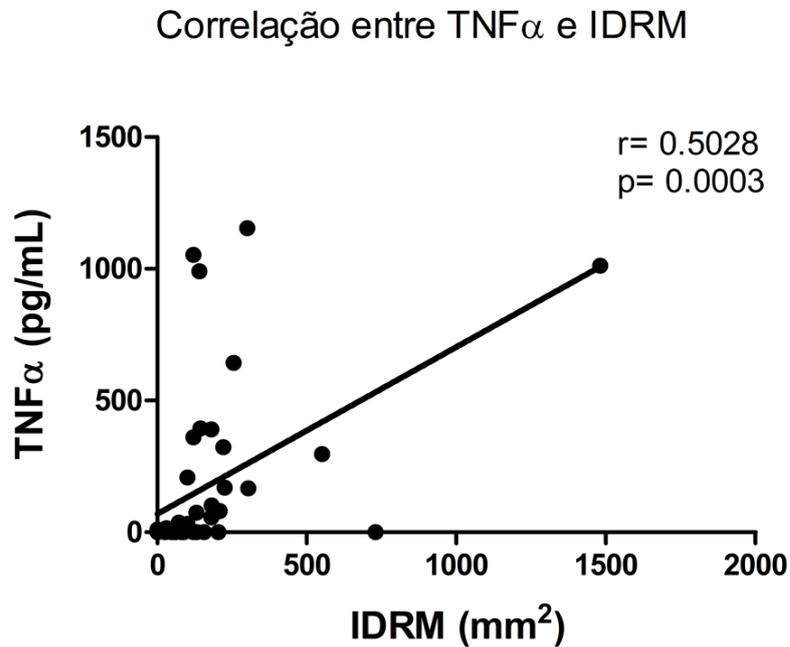


Figura 8. Correlação entre a produção de TNF- α ao antígeno solúvel de Leishmania e IDRМ. Os dados foram obtidos a partir dos valores de TNF- α (pg / ml) e IDRМ (mm²) de 47 indivíduos de área endêmica para LC. Estes dados foram analisados pelo teste de Correlação de Spearman. $p = 0,0003$, $r = 0,5028$.

A correlação entre a produção da citocina IL-2 e a IDRMM foi menor do que a correlação do IFN- γ e TNF- α , mas também foi estatisticamente significativa ($r = 0,4165/ p = 0,0044$) (Figura 9).

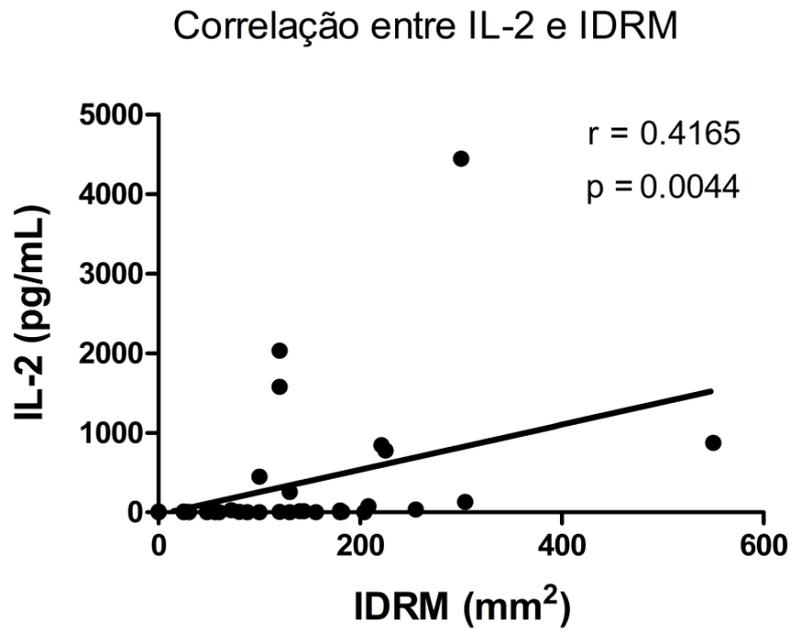


Figura 9. Correlação entre a produção de IL-2 ao antígeno solúvel de *Leishmania* e IDRMM. Os dados foram obtidos a partir dos valores de IL-2 (pg / ml) e IDRMM (mm^2) de 47 indivíduos de área endêmica para LC. Estes dados foram analisados pelo teste de Correlação de Spearman. $p = 0,0044$, $r = 0,4165$.

A correlação entre a produção da citocina IL-10 após estimulação das CMSP com SLA e a IDRМ dos 47 indivíduos não apresentou valores significantes ($r = 0,07494/ p = 0,6166$) (Figura 10).

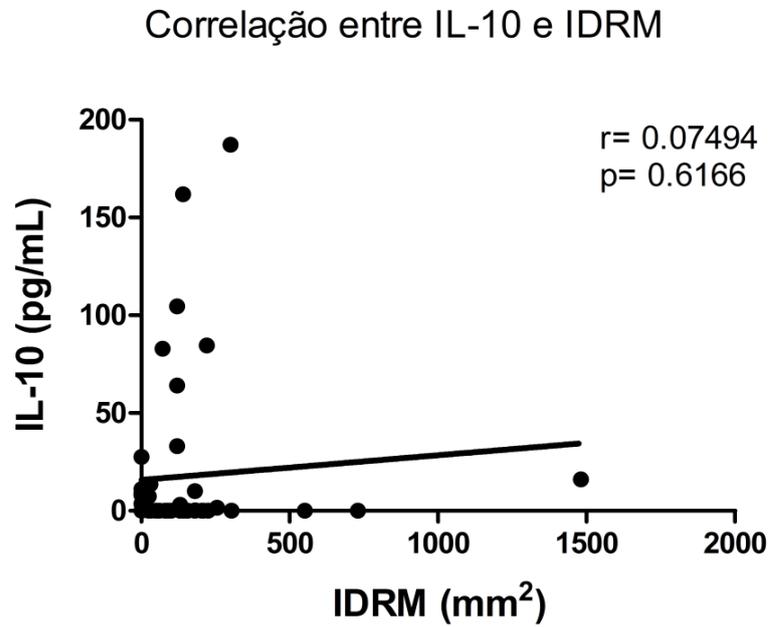


Figura 10. Correlação entre a produção de IL-10 ao antígeno solúvel de Leishmania e IDRМ. Os dados foram obtidos a partir dos valores de IL-10 (pg / ml) e IDRМ (mm²) de 47 indivíduos de área endêmica para LC. Estes dados foram analisados pelo teste de Correlação de Spearman.

VI.6. IGG TOTAL CONTRA ANTÍGENO SOLÚVEL DE *LEISHMANIA*

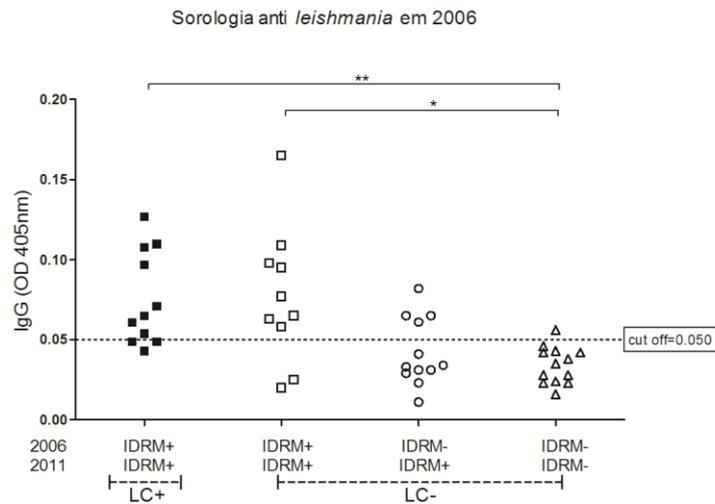
Os níveis de anticorpos IgG total contra antígenos de *L. braziliensis* foram dosados através de ensaio de ELISA nos soros dos indivíduos em 2006 (Figura 11A) e 2011 (Figura 11B). O ponto de corte de 0.050 para a sorologia no ano de 2006 foi determinado utilizando 100 indivíduos controles sabidamente sem histórico de LTA de área não endêmica e como controle positivo das placas utilizamos amostras de pacientes de LC. Em 2011 o ponto de corte foi de 0.062 e determinado como descrito anteriormente.

Na sorologia realizada em 2006, os indivíduos LC+ e IDR+ apresentaram uma média das absorbâncias (OD) igual a 0,075 e desvio padrão (DP) de 0,029. O grupo de indivíduos com LC- e IDR+ a OD foi 0,077 e o DP igual a 0,042, enquanto que os LC- e IDR- em 2006, na qual a IDR foi positiva em 2011, a OD=0,042 e DP=0,021. Os indivíduos negativos apresentaram OD=0,034 e DP=0,011.

Em relação à sorologia anti *Leishmania* realizada em 2011, os indivíduos LC+, IDR+ tanto em 2006 quanto em 2011 apresentaram OD igual a 0,110 e DP de 0,143, já os LC-, IDR+ nos dois tempos tiveram OD=0,099 e DP=0,118. Os indivíduos LC-, IDR- e que positivaram em 2011 apresentaram OD= 0,015 e DP=0,006, enquanto que os LC-, IDR- em 2006 e 2011 tiveram OD de 0,023 e DP de 0,014.

Oito (72,7%) indivíduos com LC+ e IDR+ em 2006 apresentaram sorologia positiva enquanto que este mesmo grupo com IDR+ em 2011 apresentaram 6 (54,5%) positivos. Dos dez indivíduos LC- e IDR+ em 2006 o antígeno SLA reconheceu 80% dos soros e em 2011 com IDR+ foram reconhecidos 5 (50%). Em relação aos indivíduos LC- e IDR- em 2006, 4 (33,3%) indivíduos apresentaram sorologia positiva, sendo que em 2011 todos apresentaram IDR positiva e sorologia negativa. Somente um indivíduo LC- e IDR- em 2006 apresentou anticorpos anti *Leishmania*, ocorrendo semelhantemente em 2011.

A



B

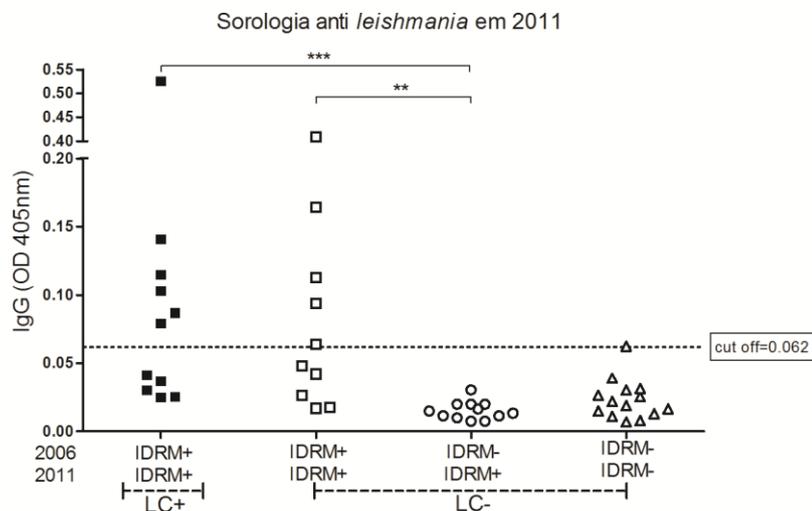


Figura 11. Sorologia anti *Leishmania* de *L. braziliensis* de indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea. O ELISA para detecção de níveis de anticorpos IgG anti *Leishmania* foi realizado empregando-se antígeno solúvel de *L. braziliensis* e foram utilizados como amostras soros de indivíduos (n=47) na presença ou ausência de histórico de LC e IDRMs positivo ou negativo do ano de 2006 (A) e 2011 (B). Os *cut off* foram estabelecidos como a média mais três desvios-padrão da densidade ótica (DO) das amostras de soro de indivíduos de uma área não-endêmica (linha pontilhada) (*cut off*: 2006=0.050/ 2011=0.062). Os valores estão apresentados por diferentes grupos, sendo que a IDRMs acima indica o resultado no ano de 2006 e abaixo no ano de 2011. Cada ponto representa a média da duplicata dos valores do mesmo soro com desvio padrão menor que 20%. Os dados sobre os níveis de anticorpos para os diferentes grupos de soros foram comparados através do teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. (* $p < 0.0001$).

VII. DISCUSSÃO

Os dados epidemiológicos e demográficos de uma população são fundamentais para a compreensão da morbidade da população como também para o planejamento de ações preventivas e de controle para as doenças infecto parasitárias, que ocupam um papel relevante entre as causas de morte no Brasil (PAES & SILVA, 1999). A população participante do inquérito sorológico de Florestal foi avaliada quanto à intradermorreação de Montenegro e sorologia anti *Leishmania*. O teste de Montenegro constitui uma ferramenta útil em estudos epidemiológicos, como para verificar a exposição prévia da população aos antígenos dos parasitos do gênero *Leishmania*, considerado um bom teste para avaliar o caráter endêmico da LT, com mais de 90% de sensibilidade e especificidade aplicada a amostras representativas da população rural de áreas endêmicas (FOLLADOR et al., 1999; GOZÁLEZ et al., 2000; TOLEDO et al., 2001; PEDRAS et al., 2003). A IDRM realizada na comunidade de Florestal nos indivíduos com histórico de Leishmaniose Cutânea acusou uma prevalência de 92,8% em 2006 e em 2011 foi similar (95%). De maneira semelhante, esta prevalência foi demonstrada na Tunísia por indivíduos curados pela infecção por *L. major*, onde 20/22 casos apresentaram IDRM positiva (SASSI et al., 1999), demonstrando que a maioria dos indivíduos que já tiveram doença ativa de LC e foram submetidos ao tratamento e cura, possuem IDRM positiva, por isso a extrema importância deste teste no diagnóstico da LTA (CARVALHO et al., 1985). No ano de 2006 os indivíduos LC-, apresentaram 19,3% de IDRM positiva, enquanto que em 2011 o percentual foi 33,1%. Este aumento pode ser devido à exposição continuada desta população com o tempo de permanência numa área endêmica. Estudos apontam que cerca de 10-20% dos indivíduos residentes em área endêmica apresentam intradermorreação de Montenegro a antígeno de *Leishmania* positivo e não desenvolvem a doença, caracterizando uma forma subclínica da Leishmaniose (FOLLADOR et al., 2002, CARVALHO et al., 2003). Nesse contexto, algumas regiões endêmicas registraram IDRM+ para LC-, como por exemplo, em Corguinho, Mato Grosso do Sul, Brasil, endêmica para *L.braziliensis*, apresentou uma prevalência de 15,7% (NUNES et al., 1995), também em Ancash e Piura, no Peru, foram registrados 17,0%, regiões endêmicas para *L.(L) peruviana* (DAVIES et al., 1995) e no Nordeste do Equador foi observada positividade da IDRM com prevalência de *L.(L) guyanensis e L.(L) panamensis* em 17,2% dos casos (ARMIJOS et al., 1997). Em outros estudos, prevalências superiores foram encontradas, como em um estudo epidemiológico realizado na cidade de San José de Hacha, na Venezuela, onde a reação

intradérmica de Montenegro foi aplicada a 121 indivíduos, dos quais 33,9% foram positivos (GONZÁLEZ et al., 2000) e em Lençóis na Bahia foi relatada uma prevalência de 43,3% de 466 indivíduos estudados (DOURADO et al., 1989). Também relacionado ao IDRМ do inquérito, 100% dos indivíduos reavaliados em 2011 com histórico de LC mantiveram o IDRМ+, demonstrando que ao longo de 5 anos esta resposta ao IDRМ persiste, corroborando com o estudo realizado em indivíduos curados, documentado por Carvalho et al. (2013). Indivíduos que adquiriram a infecção por *Leishmania* geralmente mostram expansão de linfócitos específicos do parasita, e respostas das células T são mantidos mesmo após longo tempo da cura clínica (DA-CRUZ et al., 2002). Considerando os indivíduos do inquérito sem histórico de LC e IDRМ+ em 2006, quando reavaliados em 2011, 33,3% negativaram a IDRМ, o que sugere que eles voltaram a ser susceptíveis à infecção por estarem expostos. Existem poucos estudos semelhantes que mostra o acompanhamento de indivíduos assintomáticos de LC numa área endêmica. Um estudo realizado no Irã entre 1999 e 2000 verificou apenas a resposta celular *in vivo*, para avaliar a conversão da IDRМ como um grau de proteção contra a Leishmaniose (BOROUJENI et al., 2013).

Em relação aos testes sorológicos para doenças infecciosas, o ensaio imunoenzimático ligado à enzima (ELISA) tem sido o método sorológico mais utilizado para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral, pois é fácil de executar e tem um custo baixo, além de ser realizado em laboratórios de nível intermediário utilizando um equipamento relativamente simples (SOUZA et al., 2013). O teste de ELISA para o diagnóstico da Leishmaniose Cutânea tem uma maior sensibilidade do que os exames parasitológicos, mas por apresentar pouca especificidade nos casos de doença, tem sido aperfeiçoado como auxiliar no diagnóstico de LTA, porém este mesmo teste é frequentemente utilizado para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral (LV), por ser altamente sensível (GOTO & LINDOSO, 2010). A prevalência da sorologia realizada na população do inquérito sorológico nos indivíduos com LC+ foi indiscutivelmente menor do que a IDRМ. A sorologia nos indivíduos LC- possuem valores semelhantes e inferiores com a IDRМ, apresentando 22,2% e 19,7% nos anos de 2006 e 2011 respectivamente, corroborando com alguns trabalhos que avaliaram a soroprevalência de Leishmaniose Cutânea em áreas endêmicas (AL-JAWABREH et al., 2003; JONES et al., 1986). Outros estudos mostraram que títulos significativos de anticorpos anti *Leishmania* podem ser detectados por um período de tempo relativamente longo após a cura da doença (BADARÓ et al., 1986) e no caso da persistência da positividade na sorologia dos indivíduos LC+ de 2006 para 2011 a prevalência foi de 53,4%, quase metade da IDRМ, diferentemente

encontrado na Leishmaniose Visceral, na qual a prevalência detectada pelo ELISA foi mais elevada do que a detectada pelo IDRM (CALDAS et al., 2001). Enquanto que nos indivíduos LC-, 40,6% permaneceram com sorologia positiva de 2006 para 2011, ou seja, com o passar dos anos alguns indivíduos deixaram de produzir anticorpos específicos contra SLA. Desta forma, o teste sorológico não deve ser utilizado isoladamente para confirmação diagnóstica da LC e sim associado com a clínica, epidemiologia e exames parasitológicos (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>).

Avaliando os dados demográficos da população do presente estudo, o sexo masculino (61,7%) obteve uma maior predominância em relação ao sexo feminino. De maneira similar, este resultado se assemelha ao estudo de González et al. (2000) com 68,5% de homens compondo uma comunidade da Venezuela e aos 50,6% de homens na população do Brejo de Mutambal em Minas Gerais (NUNES et al., 2006). Adicionalmente, vimos que em relação à distribuição da população por faixa etária, observou-se que 34% pertenciam a indivíduos de 6 a 25 anos de idade, semelhantemente encontrada no inquérito realizado na localidade de Corte de Pedra-Bahia, onde 30,2% da população era composta de crianças e adolescentes da faixa etária de 6 a 15 anos (SANTOS et al., 2000). Isto se deve ao fato de boa parte destes indivíduos pelo tipo de ocupação estarem mais expostos à transmissão da LTA.

Além disso, encontramos uma resposta imune celular *in vivo* de indivíduos com passado de leishmaniose cutânea mais forte de que indivíduos com a forma assintomática da doença. A área de induração da IDRM após a cura clínica apresentou-se maior quando comparamos com LC-, pois além do teste ser de grande valor preditivo devido à sua sensibilidade, os indivíduos por ter tido LC, mantêm uma intensa resposta imune caracterizando a presença clones de células T de memória a *Leishmania* (DA-CRUZ et al., 2002; CARVALHO et al., 2003)

Com relação à resposta imune celular *in vitro*, encontramos que tanto CMSP de indivíduos curados quanto indivíduos assintomáticos com persistência da IDRM produziram maiores concentrações de IFN- γ , TNF- α e IL-2 quando estimuladas com SLA, corroborando com o trabalho de Bittar et al. (2007) que não encontrou diferença na concentração de IFN- γ entre os dois grupos. É sabido que a resposta imune específica por parte do hospedeiro é caracterizada por um perfil de citocinas Th1 ao SLA, com produção de altos níveis de IFN- γ , TNF- α e desenvolvimento de dano tecidual (BACELLAR et al., 2002; ANTONELLI et al., 2005; MACHADO et al., 2002). Estas citocinas, pro inflamatórias, são importantes no

controle para o desenvolvimento da lesão por *Leishmania*, os pacientes desenvolvem úlceras de pele caracterizada por uma reação inflamatória intensa com pouco ou nenhum parasita no local da úlcera (BOGDAN et al., 2000). Portanto, ao contrário dos pacientes com LC, indivíduos assintomáticos podem ter a capacidade de modular a resposta imune, pois apesar de apresentarem menor produção de IFN- γ e TNF- α do que indivíduos com doença ativa, estes são suficiente para controlar o crescimento do parasita e não causar lesões na pele (FOLLADOR et al., 2002). De maneira contrária, a produção de IL-10 não apresentou diferença significativa entre os grupos de assintomáticos e curados. Diferentemente encontrado em um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro, em que indivíduos assintomáticos produziram maiores concentrações de IL-10 do que os indivíduos curados (BITTAR et al., 2007), o que pode estar relacionado com o tempo de cura. Salhi et al. (2008) descreve que a IL-10 possui grande importância no desenvolvimento da doença. Adicionalmente, existem claras evidências do papel da IL-10 em modelos experimentais de LTA favorecendo a proliferação da *Leishmania* e, na ausência dessa citocina, o camundongo consegue atingir uma cura estéril, com erradicação do parasita (KANE et al., 2001; BELKAID et al., 2001). Por outro lado, um equilíbrio adequado entre fatores inflamatórios e regulatórios, como por exemplo, IFN- γ e IL-10, podem favorecer o controle de parasitas e a estabilidade da cura clínica (PEREIRA-CARVALHO et al., 2013). Dessa forma, a baixa produção desta citocina nos indivíduos curados e assintomáticos favorece o controle da infecção por *L. braziliensis*.

Quando correlacionamos a IDRMs de todos os indivíduos avaliados com a produção de citocinas, encontramos uma correlação positiva e altamente significativa com IFN- γ , TNF- α e IL-2. Em pacientes com LC e LM devido à infecção por *L. braziliensis*, há uma forte associação entre a positividade da IDRMs e produção de IFN- γ de CMSP em resposta ao SLA (CARVALHO et al., 1985; SASSI et al., 1999; DA-CRUZ et al., 2002). Todavia, níveis de IFN- γ em indivíduos curados com IDRMs+ são detectados, porém em menor proporção que as CMSP estimuladas com SLA de pacientes com LC (FOLLADOR et al., 2002). Esses resultados diferem ao documentado por Schnorr et al. (2012) que encontrou discordância entre IFN- γ e IDRMs em indivíduos com evidência de exposição a infecção por *Leishmania*. Essa correlação entre a produção de citocinas e positividade da IDRMs em indivíduos curados e assintomáticos pode ser explicado pelo fato destes indivíduos apresentarem células T efetoras de memória.

Ao contrário da IDRM, a sorologia tende a negativar após o tratamento mesmo em pacientes com leishmaniose visceral onde as concentrações de anticorpos anti *Leishmania* são elevadas (CALDAS et al., 2001). Indivíduos curados com LTA tendem a diminuir e até negativar ao longo do tempo (FAGUNDES-SILVA et al., 2012). A LTA é uma doença de hipersensibilidade estimulando muito mais células T do que células B.

VIII. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Através deste estudo verificamos que tanto a resposta imune celular *in vivo* nos indivíduos curados e assintomáticos para Leishmaniose Cutânea quanto à resposta *in vitro* nestes mesmos indivíduos se apresentaram semelhantes. Dessa forma, para compreender melhor o que pode estar interferindo nesta resposta nos indivíduos sem passado de doença, mas com a persistência da intradermorreação de Montenegro e que não desenvolvem doença, pretendemos avaliar outras citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta imune destes indivíduos.

Além disso, como a sorologia nos diferentes grupos apresentou um perfil semelhante com a produção de algumas citocinas, avaliaremos a resposta humoral dosando subclasses de IgG nos indivíduos com passado de Leishmaniose Cutânea e que permanecem com IDRMs positiva, e nos indivíduos assintomáticos que mantêm a IDRMs.

IX. CONCLUSÕES

1. Indivíduos com passado de LC mantêm a IDRMs positiva após longo tempo de cura clínica.
2. Valores de IDRMs em indivíduos curados e assintomáticos são semelhantes.
3. Indivíduos curados e assintomáticos desenvolvem resposta celular com produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 em culturas de CMSP estimuladas com SLA.
4. Há uma correlação positiva significativa entre a IDRMs e produção de IFN- γ e TNF- α .
5. A frequência dos indivíduos com sorologia anti *Leishmania* diminui ao longo do tempo.
6. A resposta imune celular *in vivo* e *in vitro* de indivíduos com a forma assintomática é tão potente e duradoura quanto nos indivíduos com passado de Leishmaniose Cutânea.

X. SUMMARY

ANTI *LEISHMANIA* RESPONSE IN ASYMPTOMATIC AND CURED INDIVIDUALS IN AN ENDEMIC AREA OF AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS.

Introduction: American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is one of the six priority diseases according to the World Health Organization, affecting 1 to 1.5 million of individuals worldwide, particularly those living in tropical and subtropical areas. In Brazil, ATL is widely distributed with cases reported in all regions, especially in the North and Northeast. In Bahia, the most of ATL cases occurs in the Southeast where in the Florestal district, municipality of Jequie (Bahia), is responsible for the high ATL cases in the recent years, accounting for 55.2 % of cases. In *Leishmania* infection the host can develop a specific immune response, characterized by increased of CD4 + T cells and a profile of Th1 cytokines, demonstrated *in vivo*, Montenegro skin test (MST) and positive *in vitro* tests, such as production of high levels of IFN- γ , TNF- α and development of tissue injury. Montenegro skin test is widely used for diagnosis of ATL patients with typical cutaneous lesions and has also been used to measure exposure to *Leishmania*. However, there are individuals living in endemic areas that are infected by *L. braziliensis*, but control the infection and do not develop disease. Thus, the lack of disease on individuals exposed to the parasite is related to their protective immune response. **Objective:** The main aim of the study is to evaluate the persistence of cellular immunity on individuals with asymptomatic or healed cutaneous leishmaniasis. **Material and methods:** A cohort of individuals from an endemic area for cutaneous leishmaniasis (CL) was characterized in terms of MST and medical history of CL. We obtained blood samples, as well as MST results in 2006 that was repeated in 2011. Four groups of individuals were classified based on their status after evaluation in 2006 and 2011: individuals with LC history (CL +), positive MST (MST +) in 2006 and in 2011 (n = 11); individuals without LC history (CL -), MST + in 2006 and MST + in 2011 (n = 10); CL -, negative MST (MST -) in 2006 and MST + in 2011 (n = 12) and CL -, MST - in 2006 and 2011 (n = 14). In 2011, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from all groups and stimulated *in vitro* with *Leishmania* antigen to determine the production of cytokines. **Results:** In 2011, five years after the initial assessment (2006) individuals CL + and CL - with MST + in both years, produced high levels of IFN- γ , TNF- α and IL-2 than those who were LC -, MST - in 2006 and presented in 2011 MST +, and the group LC - and MST - in both periods of time. It was also found a significant correlation between MST and cytokine production. **Conclusion:** Thus, we conclude that the cellular immune response *in vivo* and *in vitro* from individuals with the asymptomatic form of the disease is powerful and enduring as observed in individuals with a history of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: 1. Cutaneous leishmaniasis; 2. Immune Response; 3. MST.

XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Al-Jawabreh A, Barghuthy F, Schnur LF, Jacobson RL, Schönian G, Abdeen Z. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the endemic area of Jericho, Palestine. *East Mediterr Health J.*, 9(4):805-15, 2003.
- 2) Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M, WHO. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*, 7(5), 2012.
- 3) 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.
- 4) Armijos RX, Weigel MM, Izurieta R, Racines J, Zurita C, Herrera W, Vega M. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in subtropical Ecuador. *Trop Med Int Health*, 2(2):140-52, 1997.
- 5) 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.
- 6) Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson Jr WD. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 154(6):1003-11, 1986.
- 7) 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.
- 8) Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, Rowton ED, Valenzuela JG, Charlab R, Barral-Netto M, Ribeiro JM. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg*, 62(6):740-745, 2000.
- 9) 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.
- 10) Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Ribeiro VP, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo*, 102(5):625-630, 2007.
- 11) Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 86: 51-56, 1991.

- 12) Bittencourt AL, Costa JM, Carvalho EM, Barral A. Leishmaniasis recidiva cutis in American cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, 32:802–805, 1993.
- 13) Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev*, 173:17–26, 2000.
- 14) Boroujeni AM, Aminjavaheri M, Moshtaghian B, Momeni A, Momeni AZ. Reevaluating leishmanin skin test as a marker for immunity against cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*, 52: 827–830, 2013.
- 15) Brasil, Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Secretaria de Vigilância em Saúde*, Brasília, 2 ed., 2007.
- 16) Caldas AJM, Silva DRC, Pereira CCR, Nunes PMS, Silva BP, Silva AAM, Barral A, Costa JML. Leishmania (Leishmania) chagasi infection in children from an endemic area of visceral leishmaniasis in the São Luís Island-MA, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 34(5):445-51, 2001.
- 17) Carvalho AM, Magalhães A, Carvalho LP, Bacellar O, Scott P, Carvalho EM. Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis. *BMC Infectious Diseases*, 13:529, 2013.
- 18) Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, Rocha H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol*, 135: 4144–4148, 1985.
- 19) Carvalho LP, Passos S, Schrieffer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 3, 2012.
- 20) Carvalho LP, Soto M, Jerônimo S, Dondji B, Bacellar O, Luz V, Orge GO, Alonso C, Jesus AR, Carvalho EM. Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes and Infection*, 5:7–12, 2003.
- 21) Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva - CERDEPS/PIEJ. Situação atual das Leishmanioses (Leishmaniose Tegumentar e Leishmaniose Visceral) na região sudoeste da Bahia. *Documento mimeografado*, 52 p., 2003.
- 22) Coutinho SG, Pirmez C, Mendonça SCF, Conceição-Silva F, Dórea RCC. Pathogenesis and immunopathology of leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 82: 214-28, 1987.
- 23) Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azevedo-Coutinho RB, Coutinho SG. T-cell-mediated immune response in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9(2):251–256, 2002.

- 24) Davies CR, Llanos-Cuentas EA, Pyke SDM, Dye C. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. *Epidemiology and Infection*, 114(2):297–318, 1995.
- 25) De Souza MA, Da Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto SJ, Ferreira MS. Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in American tegumentary leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 38(2):137-41, 2005.
- 26) Dourado MIC, Noronha CV, Alcantara N, Ichihara, MYT, Loureiro S. Epidemiología da leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo em localidades do Estado da Bahia (Brasil). *Revista de Saúde Pública, São Paulo*, 23: 2-8, 1989.
- 27) Fagundes-Silva GA, Vieira-Goncalves R, Nepomuceno MP, De Souza MA, Favoreto Jr S, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunology*, 34:486-91, 2012.
- 28) 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*, 11:54-8, 2002.
- 29) Follador I, Araujo C, Cardoso MA, Tavares-Neto J, Barral A, Miranda JC. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32:497-503, 1999.
- 30) 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.
- 31) Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36:71-80, 2003.
- 32) González RM, Devera R, Madrid R, Sudan CZ, Evaluación de un brote de leishmaniasis tegumentaria americana en una comunidad rural del Estado Bolívar, Venezuela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31-37, 2000.
- 33) Goto H, Lindoso J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 8(4):419-433, 2010.
- 34) IBGE. Censo Demográfico 2000, *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*, 2001.
- 35) Jones TC, Johnson Jr WD, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca F, Wiese K, Golightly L, Fikrig E, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis*, 156 (1):73-83, 1987.

- 36) Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*, 166:1141-7, 2001.
- 37) Kar, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol*, 21: 123-152, 1995.
- 38) Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*, 9, 8:604-615, 2011.
- 39) 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*, 34:69-73, 2002.
- 40) Machado PR, Araujo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismo de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 19:61-66, 2004.
- 41) Manson-Bahr PE. Diagnosis. In: The leishmaniasis. London, Peters W. & Killick-Kendrick R, 2: 703-728, 1987.
- 42) Marsden PD. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Três Braços, Bahia-Brazil. *Soc Bras Med Trop*, 27:93-101, 1994.
- 43) Mayrink W, Melo MN, Costa CA, Coutinho SG, Hermeto MV, Genaro O, Toledo VPCP, Guerra H. Multinational development of a standard skin test antigen in America: preliminary results in the Minas Gerais State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88:226, 1993.
- 44) Nunes AD, Paula EV, Teodoro R, Prata A, Silva-Vergara ML. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Varzelândia, Minas Gerais, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 22: 1343-1347, 2006.
- 45) Nunes VL, Dorval ME, Oshiro ET, Noguchi RC, Arão LB, Hans Filho G, Espíndola MA, Cristaldo G, Da Rocha HC, Serafini LN. Epidemiologic study on tegumentary leishmaniasis in the municipality of Corguinho, Mato Grosso do Sul -- Studies in the human population. *Rev Soc Bras Med Trop*, 28(3):185-93, 1995.
- 46) Oliveira F, Báfica 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.
- 47) Paes NA, Silva LAA. Doenças infecciosas e parasitárias no Brasil: uma década de transição. *Revista Panamericana de Saúde Pública*, 6: 99-109, 1999.
- 48) Pedras MJ, Orsinia M, Castro M, Passos VMA, Rabello A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 47(3):477-485, 2003.

- 49) Pereira-Carvalho R, Mendes-Aguiar CO, Oliveira-Neto MP, Covas CJF, Bertho AL, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A. *Leishmania braziliensis* - Reactive T Cells Are Down-Regulated in Long-Term Cured Cutaneous Leishmaniasis, but the Renewal Capacity of T Effector Memory Compartments Is Preserved. *Plos one*, 8(11), 2013.
- 50) Prates DB, Santos LD, Miranda JC, Souza AP, Palma MS, Barral-Netto M, Barral A. Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. *J Med Entomol* 45(3): 409-413, 2008.
- 51) Ribeiro FAQ, Lopes-Filho O. Doenças ulceragranulomatosas em Otorrinolaringologia. In: Lopes Filho O, Campos CAH. *Tratado de otorrinolaringologia*. 1 ed., Rocca, São Paulo, 71-75, 1994.
- 52) Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunol*, 3: 1041-1047, 2002.
- 53) Salhi A, Rodrigues Jr V, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, Sertorio M, Rafati S, Chevillard C, Prata A, Alcaïs A, Argiro L, Dessein A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol*, 180(9):6139-48, 2008.
- 54) Santos JB, Lauand L, Souza GS, Macêdo VO. Fatores sócio-econômicos e atitudes em relação à prevenção domiciliar da leishmaniose tegumentar americana, em uma área endêmica do sul da Bahia, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 6:701-8, 2000.
- 55) Sassi A, Louzir H, Salah AB, Mokni M, Osman AB, Dellagi K. Leishmanin skin test, lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clin Exp Immunol*, 116:127-132, 1999.
- 56) Schnorr, D, Muniz AC, Passos S, Guimaraes LH, Lago EL, Bacellar O, Glesby MJ, Carvalho EM. IFN- γ Production to *Leishmania* Antigen Supplements the *Leishmania* Skin Test in Identifying Exposure to *L. Braziliensis* Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6:12, 2012.
- 57) 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.
- 58) Silveira FT. Patogenia da leishmaniose tegumentar americana: caracterização clínica, histopatológica e imunológica da leishmaniose disseminada, com ênfase na *Leishmania (L.) amazonensis*. Tese de doutorado: *Faculdade de Medicina da USP*, São Paulo. 181(f), 2001.
- 59) Souza AP, Soto M, Costa JML, Boaventura VS, Oliveira CI, Cristal JR, Barral-Netto M, Barral A. Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using *Leishmania* Recombinant Proteins. *Plos one*, 8(6), 2013.

- 60) Toledo VPCP, Mayrink W, Gollob KJ, Oliveira MA, Costa CA, Genaro O, Pinto JA, Afonso LC. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 96(1):89-98, 2001.
- 61) Trujillo C, Ramirez R, Velez ID, Berberich C. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett*, 70: 203–209, 1999.
- 62) 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.
- 63) Volf P, Tesarova P, Nohynkova EN. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Med Vet Entomol*, 14(3) 251-256, 2000.
- 64) World Health Organization (WHO). Disponível em: <www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/index.html>. Acessado em: Novembro de 2013.
- 65) Zambrani-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol*, 18: 272-278, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O objetivo desta pesquisa é determinar o que leva algumas pessoas a desenvolverem a doença leishmaniose tegumentar (ferida brava). Nós estamos convidando você e a sua família para participarem neste estudo intitulado “Estudo da Associação de Micronutrientes (Zinco, Cobre e Ferro) na Infecção e ou Progressão para a Leishmaniose Tegumentar em Duas Comunidades Rurais do Estado da Bahia, porque vocês residem em uma região onde a LT é comum. Nós acompanharemos sua família com visitas domiciliares, com objetivo de identificar se alguém da família foi infectada pelo parasita que causa a leishmaniose tegumentar. Para isto, nós consultaremos as pessoas que moram em casa. Solicitaremos que vocês doem um pouco de sangue (aproximadamente uma colher de sopa = 15cc). Este sangue será usado para avaliar a resposta imune (defesas) contra o parasita que causa a leishmaniose. Nós também realizaremos os testes intradérmicos para determinar exposição à leishmaniose. Se alguém apresentar algum sinal de doença será encaminhado a um centro de saúde ou hospital para realização de exames laboratoriais e tratamento, caso seja necessário.

PROCEDIMENTOS

Abaixo está descrito o procedimento a ser seguido para aqueles que concordarem em participar:

1. Responder um questionário referente a sua saúde;
2. Realização de exame físico;
3. Doação de sangue, você poderá ingerir sua dieta normalmente no dia da doação. Nós faremos a assepsia do seu braço com álcool e em seguida usaremos o torniquete. Nós coletaremos sangue do seu braço, utilizando técnica estéril.
4. O teste intradérmico será realizado através da colocação dos antígenos de *Leishmania* (teste de Montenegro) na face anterior do antebraço, utilizando seringas de 1cc. Retornaremos após 48 horas para avaliar a resposta e entregar o resultado dos exames realizados.

RISCOS

Os riscos possíveis associados à participação neste estudo são os seguintes: Os riscos relacionados à coleta de sangue são sangramentos ou equimoses, infecção e desmaio. Os riscos do teste cutâneo são infecção e uma área grande de induração cujo tratamento será feito utilizando esteróide tópico.

BENEFÍCIOS

Os benefícios em participar deste estudo são que você, os membros de sua família serão monitorizados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a LT. Para os doadores de sangue, não há benefício aparente. No entanto, espera-se que o resultado deste estudo seja medidas mais efetivas para o controle da LT.

Além de nossa pesquisa, nós realizaremos testes sanguíneos e de pele que podem indicar se você tem algum problema médico. Nós trataremos os problemas médicos mais simples. Não haverá ônus para você em decorrência dos testes ou tratamento que realizaremos. Para problemas médicos mais complexos, você será encaminhado a um posto de saúde ou hospital. Este estudo não reembolsará por tratamento realizado.

CONFIDENCIALIDADE DO ESTUDO

Registro da participação neste estudo será mantido confidencial, até o limite permitido pela lei. No entanto, agências Federais regulamentadoras no Brasil, o comitê de Ética da Fundação

Oswaldo Cruz-FIOCRUZ- Bahia, pode inspecionar e copiar registros pertinentes a pesquisa e estes podem conter informações identificadoras.

Nós guardaremos os registros de cada indivíduo, em sala trancada, e somente os médicos trabalhando na equipe terão acesso a estas informações. Cada indivíduo receberá um número para ser utilizado no laboratório. Se qualquer relatório ou publicação resultar deste trabalho, a identificação do paciente não será revelada. Resultados serão relatados de forma sumarizada e o indivíduo não será identificado.

DANO ADVINDO DA PESQUISA

Se houver algum dano ou se algum problema ocorrer decorrente deste estudo, o tratamento médico será fornecido sem ônus para o paciente e será providenciado pelo Dr. Jackson Mauricio Lopes Costa ou médico que esteja trabalhando com ela. Se houver despesas oriundas de outras clínicas ou hospitais, cada indivíduo será responsável pelas despesas.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Toda participação é voluntária. Não há penalidade para alguém que decida não participar neste estudo. Ninguém também será penalizado se decidir desistir de participar do estudo, em qualquer época. O tratamento para a LT não será diferente caso você decida participar ou não desta pesquisa.

PERGUNTAS

Estimulamos que vocês façam perguntas a respeito da pesquisa. Se houver alguma pergunta, por favor, contate o Dr. Jackson M.L.Costa (71) – 3176-2200 Ramal 351 no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ Bahia, Rua Waldemar Falcão, no 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40.296-710, Brasil.

Nome da pessoa (*letra de forma*): _____

Responsável

Testemunha

Família



Assinatura do responsável

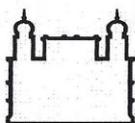
COMPROMISSO DO INVESTIGADOR

Eu discuti as questões acima apresentadas com os indivíduos participantes no estudo ou com o seu representante legalmente autorizado. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e obrigações relacionadas a este projeto.

Salvador-BA, ____ de _____ de 2007.

Assinatura do Pesquisador

ANEXO 2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

PARECER Nº 79/2005

Protocolo: 173

Projeto de Pesquisa: intitulado "Relação parasita-hospedeiro na co-infecção HIV X *Leishmania sp* e sua evolução para a Leishmaniose tegumentar".

Pesquisador Responsável: Dr. Jackson Mauricio Lopes Costa

Instituição ou Departamento: LIP/FIOCRUZ

Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados pelo responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador, 28 de dezembro de 2005


Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Coordenadora
CEP – CPqGM/FIOCRUZ

ANEXO 3

PLOS Neglected Tropical Diseases Guidelines for Authors

Detailed below are guidelines for authors about the journal, open access, the editorial process, and the production process. We also provide a [checklist for submitting manuscripts](#) for the first time, a [checklist for submitting revised manuscripts](#), and detailed [guidelines for figure and table preparation](#). *PLOS Neglected Tropical Diseases* also offers [several means of support](#) to authors in developing countries.

Preparation of Research Articles

PLOS Neglected Tropical Diseases publishes original research articles of importance to the NTDs community and the wider health community. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a more limited range of experiments.

The writing style should be concise and accessible, avoiding jargon so that the paper is understandable for readers outside a specialty or those whose first language is not English. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions. Although we encourage submissions from around the globe, we require that manuscripts be submitted in English. Authors who do not use English as a first language may contact us for additional information. As a step towards overcoming language barriers on acceptance of the paper, we encourage authors fluent in other languages to provide copies of their full articles or abstracts in other languages. We will publish these translations as supporting information and list them, together with other supporting information files, at the end of the article text.

Cover Letter

Please include a cover letter explaining why this manuscript is suitable for publication in *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Why will your research paper inspire the NTDs community, and how will it drive the understanding of NTD pathobiology, epidemiology, prevention, treatment, control, or policy?

If your study addresses an infection that is outside our [detailed scope](#), you must first send a [pre-submission inquiry](#) indicating why you consider the infection to be a neglected tropical disease.

Electronic Formats

Our submission system supports a limited range of formats for text and graphics. The following file formats/types and manuscript information are required before submission. If you are concerned about the suitability of your files, please contact us at [plosntds \[at\] plos.org](mailto:plosntds[at]plos.org).

Manuscript and Table Files

Articles can be submitted for review in DOC, DOCX, RTF, or PDF. Any articles that have been prepared in LaTeX will be accepted for review, but only in PDF format. After acceptance, only text files (RTF or DOC) of the revised manuscript and tables can be accepted for use in the production process.

Math Equations and DOCX

If your manuscript is or will be in DOCX and contains equations, you must follow the instructions below to make sure that your equations are editable when the file enters production.

If you have not yet composed your article, you can ensure that the equations in your DOCX file remain editable in DOC by enabling “Compatibility Mode” before you begin. To do this, open a new document and save as Word 97-2003 (*.doc). Several features of Word 2007/10 will now be inactive, including the built-in equation editing tool. You can insert equations in one of the two ways listed below.

If you have already composed your article as DOCX and used its built-in equation editing tool, your equations will become images when the file is saved down to DOC. To resolve this problem, re-key your equations in one of the two following ways.

1. Use MathType to create the equation. MathType is the recommended method for creating equations.
2. Go to Insert > Object > Microsoft Equation 3.0 and create the equation.

If, when saving your final document, you see a message saying “Equations will be converted to images,” your equations are no longer editable and PLOS will not be able to accept your file.

LaTeX

Articles prepared in LaTeX may be submitted in PDF format for use during the review process. After acceptance, however, .tex files and formatting information will be required as a zipped file. Please consult our [LaTeX Guidelines](#) for a list of what will be required.

Tables

Tables must conform to our [Guidelines for Figure and Table Preparation](#) and placed at the end of the article DOC or RTF file. Accepted LaTeX submissions only should have table files—which must also conform to these guidelines—uploaded individually into the online submission system.

Figure Files

Graphics files can only be submitted in EPS or TIF format. For the article to be accepted for publication, the author will need to supply high-resolution versions of the figures. When preparing your figures, please ensure that the files conform to our [Guidelines for Table and Figure Preparation](#).

If you are uploading your files in EPS format, please use the "create outlines" option under the type menu in Illustrator so that all text and fonts appear as intended in print. If you need additional help with figure preparation, please contact **figures [at] plos.org**.

Authors are encouraged to provide a striking image to accompany their article, if one is available. This image may be chosen to highlight the article on our journal Web site.

PLOS does not accept vector EPS figures generated using LaTeX. We only accept LaTeX generated figures in TIFF format. Export your LaTeX files as PDFs, and then open them in GIMP or Photoshop and save as TIFF. In general, Figures must be generated in a standalone graphics application such as Adobe Illustrator, InkScape, PyMol, MatLab, SAS, etc. Please see our [Figure Guidelines](#) for more information.

PLOS applies the [Creative Commons Attribution \(CC BY\) license](#) to all figures we publish, which allows them to be freely used, distributed, and built upon as long as proper attribution is given. Please do not submit any figures that have been previously copyrighted unless you have express written permission from the copyright holder to publish under the CC BY license.

Financial Disclosure

This section should describe sources of funding that have supported the work. Please include relevant grant numbers and the URL of any funder's Web site. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the aforementioned sentence as needed.

Competing Interests

The submitting author is asked at submission to declare, on behalf of all authors, whether there are any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced the paper. The information entered here will appear in the published version, so please do not include the same in the manuscript file.

Reviewers are also asked to declare any interests that might interfere with their objective assessment of a manuscript. Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles. Read more about PLOS's [Competing Interests Policy](#).

Abbreviations

Please keep abbreviations to a minimum and define them upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

Nomenclature

The use of standardized nomenclature in all fields of science and medicine is an essential step toward the integration and linking of scientific information reported in published literature. We will enforce the use of correct and established nomenclature wherever possible:

- We strongly encourage the use of [SI units](#). If you do not use these exclusively, please provide the SI value in parentheses after each value.
- Species names should be italicized (e.g., *Homo sapiens*) and the full genus and species must be written out in full, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper; after that, the first letter of the genus name, followed by the full species name may be used.
- Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database, e.g., [HUGO](#) for human genes. It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman: v-fes, c-MYC, etc.
- The Recommended International Non-Proprietary Name (rINN) of drugs should be provided.

Accession Numbers

All appropriate datasets, images, and information should be deposited in public resources. Please provide the relevant accession numbers (and version numbers, if appropriate). Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. Suggested databases include, but are not limited to:

- [ArrayExpress](#)
- [BioModels Database](#)

- [Database of Interacting Proteins](#)
- [DNA Data Bank of Japan \[DDBJ\]](#)
- [DRYAD](#)
- [EMBL Nucleotide Sequence Database](#)
- [GenBank](#)
- [Gene Expression Omnibus \[GEO\]](#)
- [Protein Data Bank](#)
- [UniProtKB/Swiss-Prot](#)
- [ClinicalTrials.gov](#)

In addition, as much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- [Ensembl](#)
- [Entrez Gene](#)
- [FlyBase](#)
- [InterPro](#)
- [Mouse Genome Database \(MGD\)](#)
- [Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM\)](#)
- [PubChem](#)

Providing accession numbers allows linking to and from established databases and integrates your article with a broader collection of scientific information.

Organization of the Manuscript

Most articles published in *PLOS Neglected Tropical Diseases* are organized into the following sections: [Title](#), [Authors and Affiliations](#), [Abstract](#), [Author Summary](#), [Introduction](#), [Methods](#), [Results](#), [Discussion](#), [Acknowledgments](#), [References](#), [Figure Legends](#), and [Tables](#). Uniformity in format facilitates the experience of readers and users of the journal. To provide flexibility, however, the Results and Discussion can be combined into one Results/Discussion section. All manuscripts must contain line numbers. Although we have no firm length restrictions for the entire manuscript, we urge authors to present and discuss their findings concisely.

Title (150 characters)

The title should be specific to the study yet concise, and should allow sensitive and specific electronic retrieval of the article. It should be comprehensible to readers outside your field. Avoid specialist abbreviations if possible. Titles should be presented in title case, meaning that all words except for prepositions, articles, and conjunctions should be capitalized. If the paper is a randomized controlled trial or a meta-analysis, this description should be in the title.

Examples:

- Climate Change and Spread of Lymphatic Filariasis in Sub-Saharan Africa
 - A Cluster-Randomized Controlled Trial of a Nurse-Led Deworming Program for Soil-Transmitted Helminths
- Please also provide a brief Short Title of no more than 50 characters (including spaces).

Authors and Affiliations

Provide the first names or initials (if used), middle names or initials (if used), surnames, and affiliations—department, university or organization, city, state/province (if applicable), and country—for all authors. One of the authors should be designated as the corresponding author. It is the corresponding author's responsibility to ensure that the author list, and the summary of the author contributions to the study are accurate and complete. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all consortium members and affiliations should be listed after the Acknowledgments.

(For authorship criteria, see [Supporting Information and Materials Required at Submission](#))

Abstract

The abstract succinctly introduces the paper. We advise that it should not exceed 250 – 300 words. It should mention the techniques used without going into methodological detail and summarize the most important results with important numerical results given. The abstract is conceptually divided into the following three sections with these headings: Background, Methodology/Principal Findings, and Conclusions/Significance. Please do not include any citations in the abstract. Avoid specialist abbreviations.

Author Summary

We ask that all authors of research articles include a 150- to 200-word non-technical summary of the work, immediately following the Abstract. Subject to editorial review and author revision, this short text is published with all research articles as a highlighted text box.

Distinct from the scientific abstract, the author summary should highlight where the work fits in a broader context of life science knowledge and why these findings are important to an audience that includes both scientists and non-scientists. Ideally aimed to a level of understanding of an undergraduate student, the significance of the work should be presented simply, objectively, and without exaggeration.

Authors should avoid the use of acronyms and complex scientific terms and write the author summary using the first-person voice. Authors may benefit from consulting with a science writer or press officer to ensure that they effectively communicate their findings to a general audience.

Examples are available at:

[Pseudogenization of a Sweet-Receptor Gene Accounts for Cats' Indifference toward Sugar](#)

[A Hybrid Photoreceptor Expressing Both Rod and Cone Genes in a Mouse Model of Enhanced S-Cone Syndrome](#)

[Life in Hot Carbon Monoxide: The Complete Genome Sequence of *Carboxythermus hydrogeniformans* Z-2901](#)

Introduction

The introduction should discuss the purpose of the study in the broader context. As you compose the introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about whether that aim was achieved.

Methods

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. Detailed methodology or supporting information relevant to the methodology can be published on our Web site.

This section should also include a section with descriptions of any statistical methods employed. These should conform to the criteria outlined by the Uniform Requirements, as follows: "Describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Avoid relying solely on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, which fails to convey important quantitative information. Discuss the eligibility of research participants. Give details about randomization. Describe the methods for and success of any blinding of observations. Report complications of treatment. Give numbers of observations. Report losses to observation (such as dropouts from a clinical trial). References for the design of the study and statistical methods should be to standard works when possible (with pages stated) rather than to papers in which the designs or methods were originally reported. Specify any general-use computer programs used."

Results

The results section should include all relevant positive and negative findings. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. Large datasets, including raw data, should be submitted as supporting files; these are published online alongside the accepted article. The results section should be written in past tense.

As outlined in the Uniform requirements, authors that present statistical data in the Results section, should "...specify the statistical methods used to analyze them. Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess its support. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables. Avoid nontechnical uses of technical terms in statistics, such as "random" (which implies a randomizing device), "normal," "significant," "correlations," and "sample." Define statistical terms, abbreviations, and most symbols."

Discussion

The discussion should be concise and tightly argued. It should start with a brief summary of the main findings. It should include paragraphs on the generalisability, clinical relevance, strengths, and, most importantly, the limitations of your study. You may wish to discuss the following points also. How do the conclusions affect the existing knowledge in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done?

Acknowledgments

People who contributed to the work, but do not fit the criteria for authors should be listed in the Acknowledgments, along with their contributions. You must also ensure that anyone named in the acknowledgments agrees to being so named.

Details of the funding sources that have supported the work should be confined to the funding statement provided in the online submission system. Do not include them in the acknowledgments.

References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Papers that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only as "unpublished data." All "personal communications" citations should be supported by a letter from the relevant authors.

Style information:

- PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first five authors, et al.

- References are listed and numbered in the order that they appear in the text.
- In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets.
- The parts of the manuscript should be in the correct order *before* ordering the citations: body, boxes, figure captions, tables, and supporting information captions.
- Abstracts and author summaries may not contain citations.
- Journal name abbreviations should be those found in the NCBI databases: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>.

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial. For convenience, a number of reference software companies supply PLOS style files (e.g., [Reference Manager](#), [EndNote](#)).

Published

Papers

1. Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, et al. (2011) cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Genet Mol Res* 10: 1576-1588.

Note: Use of a DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.

Accepted,

unpublished

papers

Same as above, but “In press” appears instead of the page numbers.

Electronic

Journal

Articles

1. Huynen MMTE, Martens P, Hilderink HBM (2005) The health impacts of globalisation: a conceptual framework. *Global Health* 1: 14. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>. Accessed 25 January 2012.

Books

1. Bates B (1992) *Bargaining for life: A social history of tuberculosis*. Philadelphia: University of Pennsylvania Press. 435 p.

Book

Chapters

1. Hansen B (1991) New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. *AIDS and the historian*. Bethesda: National Institutes of Health. pp. 21-28.

Figure Legends

The aim of the figure legend should be to describe the key messages of the figure, but the figure should also be discussed in the text. An enlarged version of the figure and its full legend will often be viewed in a separate window online, and it should be possible for a reader to understand the figure without switching back and forth between this window and the relevant parts of the text. Each legend should have a concise title of no more than 15 words that can stand alone, without the use of figure part labels. The overall legend itself should be succinct, while still explaining all figure parts, symbols, and abbreviations. Avoid lengthy descriptions of methods.

Tables

All tables should have a concise title. Footnotes can be used to explain abbreviations. Citations should be indicated using the same style as outlined above. Tables should not occupy more than one printed page; larger tables can be published as online supporting information. Tables must be cell-based; do not use picture elements, text boxes, tabs, or returns in tables. Please ensure that the files conform to our [Guidelines for Figure and Table Preparation](#) when preparing your tables for production.

Tables should be placed at the end of the manuscript file, rather than uploaded separately into the submission system.

Multimedia Files and Supporting Information

We encourage authors to submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting material will be subject to peer review, and should be smaller than 10 MB in size because of the difficulties that some users will experience in loading or downloading files of a greater size.

Supporting files should fall into one of the following categories: Dataset, Figure, Table, Text, Protocol, Audio, or Video. All supporting information should be referred to in the manuscript with a leading capital S (e.g., Figure S4 for the fourth supporting information figure). The numbered title and caption for each supporting information file should be included in the main article file, after the titles and captions for the main figures.

Supporting files may be submitted in a variety of formats, but should be publication-ready, as these files are not copyedited. Carefully consider whether your supporting information needs to be searchable and/or editable, and choose the most suitable format accordingly. See the [Supporting Information Guidelines](#) for more details about our requirements for supporting information and multimedia files.

Submission of Research Manuscripts

Are You Ready to Submit Your Manuscript?

We have provided an [author checklist](#) to help you prepare your materials for submission and to make the online submission process as straightforward as possible. Please take the time to look through the list before submitting your article.

If you are submitting a revised manuscript, you will have been given substantial guidance by the editors. We have provided a [checklist for revised manuscripts](#).

Electronic Submission

Detailed instructions for submission can be found on the [PLOS Neglected Tropical Diseases Manuscript Submission and Peer Review Web site](#). Files are uploaded individually and are combined into a single PDF file, which must be approved by the author at the end of the submission process.

Text files can be submitted in DOC or RTF format. Please [convert LaTeX files](#) to one of the acceptable formats. Graphics files can only be submitted in EPS or TIF format. If possible, please label all figures with a standard font such as Arial or Times New Roman. Please read the [Guidelines for Figure Preparation](#) before submitting figures.