



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE (PPgCS)**



**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE FAMILIARES DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA RESIDENTES EM UMA
ÁREA ENDÊMICA DE TRANSMISSÃO DE
Leishmania braziliensis.**

Aline do Couto Muniz

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Salvador (Bahia), 2012

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

M966 Muniz, Aline do Couto

Caracterização da resposta imune de familiares de pacientes com leishmaniose cutânea residentes em uma área endêmica de transmissão de leishmania braziliensis/ Aline do Couto Muniz - Salvador, 2012.

80 f.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Olívia Amado Ramos Bacellar

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Escola de Medicina, 2012.

1. Doenças Transmissíveis. 2. Infecção. 3. Endemia. I. Bacellar, Maria Olívia Amado Ramos. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU: 616.9

ALINE DO COUTO MUNIZ

**Caracterização da Resposta Imune de Familiares de Pacientes com
Leishmaniose Cutânea Residentes em uma Área Endêmica de Transmissão
de *Leishmania braziliensis*.**

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

Professor- Orientador: Maria Olívia Amado Ramos Bacellar

Salvador – Bahia
2012

COMISSAO EXAMINADORA**Membros Titulares:**

- Nicolaus Albert Borges Schriefer (Presidente), Pesquisador do Serviço de Imunologia do Hospital das Clínicas -UFBA; professor permanente dos programas de Pós Graduação em Imunologia (PPGIm) e de Ciências da Saúde (PPGCS),UFBA;
- Ricardo Riccio Oliveira, Pesquisador do Serviço de Imunologia do Hospital das Clínicas - UFBA; Professor Adjunto da Universidade Federal da Bahia;
- Camila Indiani de Oliveira, Pesquisadora da FIOCRUZ; Professora permanente do curso de pós-graduação em Patologia, dos programas de Pós Graduação em Imunologia (PPGIm) e de Ciências da Saúde (PPGCS),UFBA.

Membros Suplentes:

- Maria Olívia Amado Ramos Bacellar (Orientadora), pesquisadora do Serviço de Imunologia do Hospital das Clínicas-UFBA, professora permanente dos programas de Pós Graduação em Imunologia (PPGIm) e de Ciências da Saúde (PPGCS),UFBA.

*"Mas os que confiam no Senhor, renovarão as suas forças. Subirão com asas como águias;
correrão e não se cansarão; andarão sem desfalecerem."*

Isaías 40:31

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu Deus, pois, sem Ti nada sou e nada tem sentido.

A minha mãe, Maria Auxiliadora, pelo que sou e por ter me guiado até aqui. Por ser meu alicerce, meu porto seguro, minha luz. Amo-te.

Aos meus irmãos Luciane, Jaqueline e Leonardo por existirem na minha vida. Saibam que mesmo distantes não há um dia que eu não pense em vocês.

A Diomar de Jesus Pereira, meu amigo, meu companheiro. Pelas palavras de carinho e conforto sempre presente ao longo dos anos e pela força para realização deste trabalho. Pelo amor que a mim dedica.

Aos meus amigos que, como vivo dizendo, são a família que me foi permitida escolher e dada de presente por Deus. Agradeço pela compreensão, pela força, pela paciência em se absterem de minha companhia. Obrigada por existirem em minha vida. E agradeço a aqueles que mesmo distante sempre torceram e oraram por mim.

Aos pacientes e familiares que concordaram em participar deste projeto. Espero com isto de alguma forma um dia, podê-los ajudar na luta contra a leishmaniose.

FONTES DE FINANCIAMENTO

- 1- Fogarty International Clinical Research Scholars and Fellows (FICRS-F) através do programa NIH/Fogarty International Center (R24 TW007988), NIH/NIAID K24 AI078884 and NIH/NIAID AI-30639.
- 2- Bolsa de estudo CAPES.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos pacientes e familiares participantes desse estudo que me receberam tão bem e participaram deste trabalho sempre com muita disposição e carinho.

Ao chefe e professor Dr. Edgar Marcelino Carvalho por ter se tornado um marco na minha vida, alvo de admiração e ser um exemplo de respeito e conhecimento a ser seguido e, a minha orientadora Dr^a Maria Olívia Amado Ramos Bacelar por me oferecerem esta oportunidade e me guiarem por ela. Por me passarem suas experiências, por servir como espelho para a minha profissão e para a minha vida. Serei eternamente grata.

A Ednaldo Lago, meu companheiro e guia de campo. Ao exemplo de determinação e trabalho que você é.

A Daniel Schnorr pela realização da coleta de campo inicial e realização da parte epidemiológica.

A Luiz Henrique Guimarães, médico do Serviço de Imunologia e colega do PPgCS, que também participa neste trabalho avaliando os pacientes e familiares moradores da área endêmica.

A Dr^a Sara Passos pela ajuda, incentivo e esclarecimentos na realização deste trabalho.

A todas as meninas do Posto de Saúde de Corte de Pedra que me receberam tão bem e me ajudaram muito. Tenho um carinho enorme por vocês.

A dona Nilda, funcionária da casa de Corte de Pedra pela hospitalidade e atenção.

A todos os colaboradores e amigos do Serviço de Imunologia (SIM) do Hospital Universitário Professor Edgar Santos que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada pela convivência, incentivo, ensinamentos e momentos de alegria. Em especial a: Thiago Marconi, Walker Nonato, Eduardo Viana, Ludmila Polari, Michael Macedo, Álvaro Machado e Ângela Giudice. Vocês do SIM são uma família pra mim.

Aos professores e queridos colegas do PPgCS pelo conhecimento e trocas de experiências que me foi passado. Todos são muito especiais.

À Cibele Barbosa, Secretária do PPgCS, pela ajuda e atenção durante todo o curso.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para esta jornada e não foram citadas. Peço perdão e agradeço por tudo.

A CAPES, pelo fomento ao estudo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE FIGURAS	16
I. RESUMO	17
II. OBJETIVOS	19
II.1 OBJETIVO GERAL	19
II.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
III. INTRODUÇÃO	20
IV. REVISÃO DE LITERATURA	22
IV.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E BIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	22
IV.2 ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	25
IV.3. INFECÇÃO SUB-CLÍNICA POR <i>LEISHMANIA</i>	27
IV.4 QUIMIOCINAS	29
V. HIPÓTESES	31
VI. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	32
VI.1 DESENHO DO ESTUDO	32
VI.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO	32
VI.3 ÁREA DE ESTUDO	33
VI.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	35

VI.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	35
VI.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE	36
VI.7 TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (TESTE DE MONTENEGRO) PARA O ANTÍGENO DE LEISHMANIA:	37
VI.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
VI.9. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	38
VII. RESULTADOS	39
VII.1. DETERMINAÇÃO DA EVIDÊNCIA DE EXPOSIÇÃO À INFECÇÃO POR <i>L.braziliensis</i>	39
VII.2. DADOS DEMOGRÁFICOS E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS CASOS ÍNDICES E DOS CONTATOS FAMILIARES COM OU SEM EVIDÊNCIA DE RESPOSTA IMUNE	42
VII.3. CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE IFN- γ E O TESTE DE MONTENEGRO	45
VII.4 PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS EM INDIVÍDUOS COM E SEM EVIDÊNCIA DE RESPOSTA IMUNE.	46
VII.5 PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS EM CULTURAS SEM ESTÍMULO E COM ESTÍMULO COM ANTÍGENO SOLÚVEL DE LEISHMANIA NOS DIFERENTES GRUPOS.	48
VII. 6 CORRELAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO DE IFN- γ E PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS.	52
VIII. DISCUSSÃO	55
IX. PERSPECTIVAS DE ESTUDO	61
X. CONCLUSÕES	62
XI. SUMMARY	63
XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

XIII. ANEXOS	72
ANEXO 1. MODELO DO QUESTIONÁRIO	73
ANEXO 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	77
ANEXO 3. OFÍCIO DO COMITÊ DE ÉTICA DA MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
CCL2	Proteína quimioatraente de monócitos.
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CXCL 9	Monoquina induzida por interferon gama.
CXCL10	Proteína indutora de IFN- γ .
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay, teste imunoenzimático
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12p40	Interleucina 12 subunidade p40
IL-5	Interleucina 5
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
NK	Células natural killer
NKT	Célula T que expressa marcadores de células NK
NO	Óxido Nítrico
PHA	Phytohemaglutinina

PPD	“purified protein derivative” – Intradermo reação para tuberculose
RM	Reação de Montenegro
SLA	Antígeno solúvel de leishmania
T CD4+	Célula T apresentando a molécula CD4 na sua superfície.
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
Th1	T “helper” (auxiliadora) do tipo 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
K	Valor de kappa.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aspectos epidemiológicos dos pacientes com leishmaniose cutânea e de familiares residentes na mesma casa com ou sem evidência de resposta imune ao antígeno de leishmania. 43

Tabela 2 – Produção de quimiocinas em contatos domiciliares com e sem evidência de resposta imune ao antígeno de leishmania. 46

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Seleção de familiares de pacientes com leishmaniose cutânea sem evidência de doença ativa ou pregressa e frequência de indivíduos com evidência de resposta imune ao antígeno de leishmania.	40
FIGURA 2: Correlação entre a produção de IFN-γ e o teste de Montenegro em contatos domiciliares de pacientes com LC.	45
FIGURA 3: Produção de CXCL9 nos diferentes grupos.	48
FIGURA 4: Produção de CXCL10 nos diferentes grupos.	50
FIGURA 5: Produção de CCL2 nos diferentes grupos.	51
FIGURA 6: Correlação entre a produção de IFN-γ e CXCL9.	52
FIGURA 7: Correlação entre a produção de IFN-γ e CXCL10.	53
FIGURA 8: Correlação entre a produção de IFN-γ e CCL2.	54

I. RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE FAMILIARES DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA RESIDENTES EM UMA ÁREA ENDÊMICA DE TRANSMISSÃO DE *Leishmania braziliensis*. Introdução: Do ponto de vista imunológico a leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada pela produção exagerada de IFN- γ antígeno específica e teste de hipersensibilidade tardia positiva ao antígeno do parasito (Reação de Montenegro). Este teste é utilizado para o diagnóstico da doença e também para a determinação de exposição a antígenos do parasito, mesmo na ausência da doença. Cerca de 10% dos indivíduos sadios residentes em área de transmissão de *L. braziliensis* respondem a Reação de Montenegro (RM), mesmo sem apresentar manifestações clínicas da doença. Objetivo: Identificar em familiares de pacientes com leishmaniose cutânea sem sinais da doença ativa ou pregressa, evidência de exposição à *L. braziliensis* e avaliar a resposta imune nesses indivíduos. Materiais e Métodos: Este estudo incluiu 308 contatos domiciliares de pacientes com LC moradores em uma área endêmica de transmissão de *L. braziliensis* na Bahia, Brasil. Foi avaliada produção de IFN- γ antígeno específica em sangue total através da técnica de ELISA e em seguida foi realizado a RM. A evidência de resposta imune foi baseada na RM positiva e/ou produção *in vitro* de IFN- γ em culturas estimuladas com antígeno de leishmania. Foi avaliada também a produção de CXCL9, CXCL10 e CCL2 através da técnica de ELISA. Resultados: A evidência de resposta imune foi observada em 54 (17,5%) dos 308 indivíduos avaliados. Especificamente 36 (11,6%) familiares tiveram a RM positiva e 40 (12,9%) produziram IFN- γ . Todavia, dos 36 indivíduos com RM positiva, a produção de IFN- γ somente foi observada em 22(61,1%) e em 40 familiares produtores de IFN- γ 22 (55%) tiveram a RM positiva. Apesar de haver correlação entre a RM e a produção de IFN- γ ($p < 0,0001$), uma concordância moderada entre a produção de IFN- γ e a RM ($\kappa = 0,49$) foi observada. Indivíduos com evidência de resposta imune produziram mais CXCL9, CXCL10 e CCL2 que indivíduos sem evidência de resposta imune. Além disso, uma correlação direta entre a produção de IFN- γ e o diâmetro da RM e a produção de quimiocinas foi observada. Apesar de a RM ser considerada um marcador de infecção por *L. braziliensis*, uma elevada porcentagem de indivíduos com reação negativa produziu quimiocinas e IFN- γ . Conclusão: Mais de um teste imunológico precisa ser utilizado para identificação de exposição à *L. braziliensis*. Em adição a RM a avaliação da produção de IFN- γ deve ser

realizada. Adicionalmente, determinação de quimiocinas pode ser usada como marcador de exposição a *L. braziliensis*.

Palavras-chave: 1. Leishmaniose Cutânea; 2. Infecção por *L. braziliensis*; 3. Reação de Montenegro; 4. Quimiocinas.

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GERAL

Identificar em familiares de pacientes com leishmaniose cutânea sem sinais da doença ativa ou pregressa, evidência de exposição à *L. braziliensis*.

II. 2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Avaliar a resposta imune de familiares de pacientes com leishmaniose cutânea residentes no mesmo domicílio dos casos índices sem evidência de doença ativa ou pregressa por *L. braziliensis*;
2. Identificar se em adição ao teste de hipersensibilidade tardia, a produção *in vitro* de IFN- γ é indicativo de existência de exposição à *L. braziliensis*;
3. Avaliar a produção de quimiocinas em indivíduos com evidência de exposição à *L. braziliensis*.

III. INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos o Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos tem realizado estudos epidemiológicos, clínicos e imunológicos na área endêmica de leishmaniose tegumentar, na vila de Corte de Pedra, município de Tancredo Neves. Esta é uma área de transmissão de *L. braziliensis* que registra as maiores taxas de incidência no estado.

Nessa área endêmica o número de casos de leishmaniose cutânea (LC) vem aumentando nos últimos 20 anos. Enquanto na década de 80 cerca de 300 casos/ano de leishmaniose cutânea eram cadastrados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, entre 2005 e 2006 um total de 1396 casos foram atendidos neste centro (Guimarães et al. 2009) e em 2008 mais de 2000 casos de leishmaniose foram acompanhados no Posto de saúde de Corte de Pedra. Outro aspecto epidemiológico importante e que facilitou a realização deste estudo nesta área é a ocorrência de agregação familiar de casos de leishmaniose cutânea. Em um estudo recente, enquanto a prevalência de leishmaniose cutânea entre familiares de casos índices de leishmaniose foi de 36%, em familiares de controles a prevalência de leishmaniose cutânea foi de 19% (Castellucci et al. 2005), indicando que fatores ambientais e/ou fatores genéticos influenciam a evolução clínica de infecção por *L. braziliensis*. Em adição aos que desenvolvem a doença cerca de 10% dos indivíduos residentes em uma área endêmica apresentam evidência de resposta à Reação de Montenegro (RM) sem que apresentem manifestações clínicas sendo consideradas como portadores de uma forma subclínica da leishmaniose cutânea (Follador et al. 2002). Todavia, é possível que além da Reação de Montenegro outros testes tenham a capacidade de determinar exposição à *L. braziliensis* assim como determinar infecção subclínica. Devido a LC ocorrer predominantemente em familiares de indivíduos acometidos pela doença, uma estratégia importante para identificar

indivíduos expostos à infecção é avaliar familiares de pacientes com leishmaniose cutânea. No presente estudo além de estabelecer uma coorte de familiares residentes no mesmo domicílio de pacientes com leishmaniose cutânea foi também avaliado se outros testes, em adição a reação de Montenegro, podem determinar exposição à *L. braziliensis*.

IV. REVISÃO DE LITERATURA

IV.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E BIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) constitui um problema de saúde pública no Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo. A incidência anual de casos da doença é de 1.500.000 em todo o mundo e cerca de 400 milhões de pessoas estão expostas à infecção (Desjeux, 2004). Dados epidemiológicos demonstram que, no Brasil, a LTA representa a segunda doença tropical de maior prevalência, sendo as regiões norte e nordeste as principais áreas endêmicas (Brasil, 2007).

A LTA é uma zoonose causada por protozoários parasitas intracelulares do gênero *Leishmania*, com uma ampla distribuição geográfica em áreas tropicais e subtropicais das Américas (OPAS, 1994). É causada predominantemente pela *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania amazonensis* (Lainson, 1983; Grimaldi et al. 1989; Kedzierski et al. 2006) sendo endêmica na América do Sul e América Central.

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da doença, e se caracteriza por uma lesão ulcerada única com bordas elevadas, frequentemente localizada nos membros inferiores (Llanos Cuentas et al. 1984). Tem uma incidência de 8.1 casos por 1.000 pessoas no sul do estado da Bahia onde a *L. braziliensis* é responsável por mais do que 95% dos casos de leishmaniose cutânea (Jones et al, 1987). A vila de Corte de Pedra, município de Tancredo Neves, localizada no sudeste da Bahia, situada à cerca de 300 km da cidade de Salvador, é uma área de transmissão de *L. braziliensis* e registra as maiores taxas de incidência no estado. Lá são encontradas as três formas de leishmaniose tegumentar causadas por *L. braziliensis*, a

leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose disseminada (LD) e a leishmaniose mucosa (LM). Mas a leishmaniose tem sido assinalada em todos os estados, constituindo, portanto, uma das afecções dermatológicas que merece maior atenção, devido à magnitude da doença, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem. Existem também reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (FUNASA, 2000).

Os parasitas do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitos de um mamífero a outro. Nos hospedeiros mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, os parasitos assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitos que são fagocitados por outros macrófagos. As espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da sub-família Phebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos flebotomíneos as leishmanias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo. Ali, as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas (Killick-Kendrick, 1979, 1990, 1991 *apud* Gontijo & Carvalho, 2003), sendo posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada.

Durante esse processo, o conteúdo da glândula salivar é depositado no local da picada, promovendo o bloqueio de mecanismos hemostáticos do hospedeiro que beneficiam o vetor na obtenção do alimento (Teixeira et al. 2005)

Sendo assim, a epidemiologia da leishmaniose depende das características da espécie do parasito, as características ecológicas dos locais de transmissão, a exposição atual e passada da população humana ao parasito e da resposta imune do hospedeiro.

IV.2 ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

O principal mecanismo de defesa contra a leishmania é mediado por uma resposta do tipo Th1 com produção de IFN- γ que ativa os macrófagos para matar o parasito. A reação de hipersensibilidade tardia positiva contra o antígeno de leishmania (Reação de Montenegro), bem como a proliferação de linfócitos e alta produção de INF- γ e TNF- α são características da LC (Carvalho et al. 1985; Bacellar et al. 2002).

Estudos experimentais demonstram que, nas fases iniciais da infecção por leishmania, a relação parasita-hospedeiro ocorre de forma semelhante nos animais resistentes e susceptíveis à doença. Neste estágio, o neutrófilo tem papel importante na destruição do parasita, sua atividade leishmanicida relaciona-se à presença da enzima mieloperoxidase e a produção de metabólitos do oxigênio e do nitrogênio, gerados por mecanismo fagocitose induzida.

Já está bem documentado que a produção de IFN- γ é importante para o controle da infecção por leishmania por estimular a produção de óxido nítrico e superóxido por fagócitos (Murray et al. 1983; Liew et al. 1991) Na ausência da ativação de células Th1 a produção de IFN- γ é baixa ou ausente, os macrófagos perdem a capacidade de destruir leishmanias e formas disseminadas da leishmaniose são observadas assim como a leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea difusa (Carvalho et al. 1985; Bomfim et al. 1996). Todavia nas formas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar a despeito de existir uma resposta imune protetora, os pacientes evoluem para a doença. Evidências têm sido acumuladas de que a resposta imune participa da lesão tecidual da leishmaniose tegumentar: 1) Os pacientes com LC e LM apresentam altas produções de IFN- γ e TNF- α (Ribeiro de Jesus, 1998; Bacellar, 2002) mas em vez de controlar a infecção, desenvolvem úlceras cutâneas e mucosas; 2)

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LM e LC quando estimuladas com antígeno de *L.braziliensis in vitro* produzem baixa concentração de IL-10 e a adição exógena dessa citocina não modula a produção de IFN- γ e TNF- α nesses pacientes (Bacellar, 2002); 3) Embora IL-10 seja expressa em células da lesão de pacientes com LM e LC, as células da lesão mucosa expressam menos receptor de IL-10 do que células da lesão cutânea (Faria, 2005); 4) O uso da pentoxifilina (inibidor da produção de TNF- α) associada ao antimônio (droga de primeira escolha no tratamento das leishmanioses), cura pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa que são refratários ao tratamento com antimonial (Lessa et al. 2001) e associação de antimonial com pentoxifilina é mais efetiva que o antimonial sozinho na cura de leishmaniose mucosa (Machado et al. 2007).

IV.3. INFECÇÃO SUB-CLÍNICA POR *LEISHMANIA*

Desde a década de 60 já tinha sido demonstrada a existência de infecção assintomática por *L. mexicana*. (González & Biagi. 1968). Um estudo em uma área endêmica do Espírito Santo teve por objetivo entender um pouco mais sobre as infecções subclínicas e reavaliar os métodos diagnósticos que pudessem caracterizá-las (Guerra et al. 1985). Infecção subclínica por leishmania tem sido mostrada em áreas endêmicas de *Leishmania chagasi*, agente que causa a leishmaniose visceral (Carvalho, 1994).

Como prova de infecção subclínica outros estudos mostram que indivíduos sem história de doença podem apresentar evidência de infecção demonstrada através do teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de leishmania que é utilizado para determinar a prevalência de exposição à leishmania (Guerra et al. 1985; Weigle et al.1991; Follador et al. 1999; Camera et al. 2006).

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

Na Colômbia um estudo mostrou que as respostas à Reação de Montenegro foram ligeiramente maiores entre os indivíduos assintomáticos quando comparados com indivíduos com LC e que a proliferação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi semelhante a dos indivíduos com LC assim como, a produção de IFN- γ , IL-12p40 e IL-10 após exposição *in vitro* à *L. panamensis* (Trujillo et al. 2002).

Embora poucos estudos tenham sido realizados para avaliar a prevalência da infecção sub-clínica por *L.braziliensis*, a reação de Montenegro positiva na ausência de manifestações clínicas de LTA foi observado em aproximadamente 10% dos indivíduos que residem em áreas de transmissão de *L. braziliensis*. (Davies et al. 1995; Follador et al. 2002).

Evidência de infecção subclínica por *L. chagasi* foi determinada por um ELISA positivo ou teste intradérmico e foi documentada em 18 de 40 parentes (45%) e em 26 dos 95 (27%) vizinhos do caso índice de leishmaniose visceral. Além disso, a produção de IFN- γ nos indivíduos assintomáticos foi maior do que a encontrada nos indivíduos com leishmaniose visceral ativa e similar aos indivíduos curados (D'Oliveira Júnior et al. 1997). Sassi et al. (1999), mostraram que a infecção assintomática por *L. major* induz uma resposta imune celular similar em intensidade à aquelas dos pacientes curados.

Os indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis* apresentam uma produção mais baixa de IFN- γ e TNF- α quando comparados com pacientes com leishmaniose cutânea após estimulação *in vitro* com antígeno solúvel de *L.braziliensis* (SLA) (Follador et al. 2002). Por outro lado, células destes indivíduos produzem mais IL-5 e IL-10 que pacientes com leishmaniose cutânea (Follador, 1999; Bittar, 2007). Todavia, o mecanismo pelo quais os portadores de infecção subclínica por *L. braziliensis* controlam a infecção não é determinado. Até o momento a reação de Montenegro é o único marcador indicativo de exposição prévia à *L. braziliensis*. Para o entendimento da patogênese da doença é importante determinar a relação entre exposição ao parasito e desenvolvimento da doença. Para isso faz-se necessário que seja identificado, além da reação de Montenegro, se existem outros marcadores de exposição à infecção por *L. braziliensis*.

IV.4 QUIMIOCINAS

As quimiocinas são um sub-grupo de citocinas e que tem como principal propriedade o recrutamento seletivo dos leucócitos para o local da infecção. A maioria das quimiocinas atraem neutrófilos e monócitos enquanto CXCL9 (monoquina induzida por IFN- γ) e CXCL10 (proteína indutora de IFN- γ), estão envolvidas no recrutamento e ativação de células T (Ritter & Korner, 2002). O recrutamento da população celular no início da infecção parece ter papel importante no desenvolvimento da doença. Após a infecção por leishmania os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao sítio da infecção seguida pelos monócitos/macrófagos. Durante esta fase membros da família das quimiocinas tem uma importância fundamental na atração dos subtipos de leucócitos no sítio da infecção e também de estimulá-los (Rot & Andrian, 2004). O papel das quimiocinas na infecção por leishmania, além do recrutamento dos leucócitos, inclui participação na imunidade mediada por células, ativação celular e atividade leishmanicida (Teixeira, 2006). A produção de diferentes padrões de quimiocinas associadas às várias formas clínicas da leishmaniose tegumentar sugere uma importante participação dessas moléculas na resposta imune na leishmaniose. Por exemplo, as lesões de pacientes com leishmaniose cutânea localizada auto curável apresentam alta expressão de CCL2, CXCL9 e CXCL10 (Ritter & Korner, 2002). Em uma área de transmissão de *L. donovani* a produção de CXCL9 e CXCL10 foi menor nos indivíduos com infecção assintomática que nos pacientes com leishmaniose visceral (Hailu et al. 2004). CCL2, uma quimiocina que atrai monócitos e células TCD4⁺ (Penido, 2003) também está envolvida na ativação de macrófagos para matar leishmania (Brandonisio et al. 2002). Entretanto, recentemente, um estudo mostrou que macrófagos de indivíduos com infecção subclínica, infectados com *L. braziliensis* produzem menos CXCL9 e CCL2 que macrófagos de pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, sugerindo que essas

moléculas participam também da forte resposta inflamatória observada na LTA (Giudice et al. 2011).

VI. HIPÓTESE

- Em adição ao teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de leishmania, evidência de infecção por *L.braziliensis* pode ser identificada por outros testes imunológicos.

VII. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

VI.1 DESENHO DO ESTUDO

Inicialmente foi estabelecida uma coorte de familiares de pacientes com leishmaniose cutânea sem evidência atual ou pregressa da doença. Para a identificação de marcadores imunológicos de exposição ao parasito foi realizado um estudo de corte transversal nestes familiares de pacientes com leishmaniose cutânea.

VI.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Para determinar o número de familiares de pacientes com leishmaniose cutânea que deviam participar da coorte, um cálculo amostral foi feito baseado em estudo anterior no qual foi documentado que a frequência de casos de LC ativa ou pregressa entre familiares de casos índices de leishmaniose cutânea foi de 34% (Castellucci et al. 2005). Baseado na estimativa que 10% dos indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis* desenvolverão leishmaniose e que 40% dos indivíduos sem evidência de resposta imune a antígeno de leishmania, desenvolverão leishmaniose, um total de 240 indivíduos (120 por grupo) terá um poder de 80% para detectar uma diferença significativa de 0.05 assumindo 10% de perda.

Foram identificados 76 casos índices que foram selecionados por terem apresentado a doença um ano antes do início deste trabalho e por residirem a uma distância de até 25 km do posto de Saúde de Corte de Pedra. A partir destes pacientes foram identificados 533 contatos familiares. Destes, 512 indivíduos avaliados, 204 apresentavam doença ativa ou história pregressa e foram excluídos do estudo. Nos 308 familiares que não apresentaram evidências de sinais de doença ou de lesão cicatricial compatível com leishmaniose cutânea, foi aplicado

um questionário com sobre aspectos demográficos e ambientais (ANEXO 1) e sangue foi coletado para realização da avaliação da produção *in vitro* de citocinas e quimiocinas. Posteriormente à coleta de sangue, o teste de Montenegro foi realizado.

Após os resultados da Reação de Montenegro e da produção IFN- γ foram identificados 54 indivíduos com evidência de resposta imune que foram divididos em 3 grupos: 22 indivíduos com RM (+) IFN- γ (+), 14 indivíduos com RM (+) IFN- γ (-) e 18 indivíduos com RM (-) IFN- γ (+). Dos indivíduos sem evidência de resposta imune 51 foram selecionados para participar do grupo controle: RM (-) IFN- γ (-). Estes últimos indivíduos foram pareados levando em consideração o local de moradia, sexo e idade.

VI.3 ÁREA DE ESTUDO

Há mais de 25 anos o Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (ComHUPES) desenvolve trabalhos de pesquisa clínica e imunológica (Carvalho et al. 1985; Schriefer et al. 2004; Machado et al. 2011) e promove assistência a pacientes com leishmaniose tegumentar no Sudeste da Bahia onde em 1986 foi construído o Posto de Saúde de Corte de Pedra, que se tornou referência para diagnóstico e tratamento da LTA. Corte de Pedra, uma região rural no Nordeste do Brasil endêmica para leishmaniose tegumentar americana, pertence ao município de Tancredo Neves situado a cerca de 280 km de Salvador. A área era anteriormente dominada pela Mata Atlântica e agora é uma comunidade formada majoritariamente por áreas desmatadas agrícolas. *Lutzomyia whitmany* e *Lutzomyia intermedia*, flebotomíneos que transmitem *L. braziliensis* são endêmicos na fauna local (Grimaldi et al. 1989; Miranda et al. 2002). Adicionalmente, a cada duas semanas, uma equipe de médicos e pesquisadores do Serviço de Imunologia, atende

pacientes no posto, ocasião em que são selecionados os casos que participarão dos projetos de pesquisa. A estrutura do posto de saúde de Corte de Pedra torna capaz o atendimento dos indivíduos desta área endêmica, fornecendo tratamento adequado quando necessário.

VI.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

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

VI.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

1. Pacientes com leishmaniose cutânea ou cicatriz típica da doença;
2. Indivíduos que realizaram o teste de Montenegro até 3 meses antes da data de coleta de sangue;
3. Não concordar em participar da pesquisa.

VI.6. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

Foram coletados 15 ml de sangue heparinizado de cada participante antes da realização da Reação de Montenegro. Um mL de sangue total foi colocado em uma placa de 24 orifícios (Thechno Plastic Productcs AG) onde foi adicionado o antígeno solúvel de *L. braziliensis* (SLA) na concentração de 20µg/mL. Como controle positivo da cultura, o sangue total também foi estimulado com o mitógeno Phitohemaglutinina (PHA) na diluição de 1:10. Logo após, as placa foram incubadas à 37⁰C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 72 horas. Após esse período foi coletado o sobrenadante, e as amostras foram estocadas à - 20⁰C para dosagem de citocinas e quimiocinas. A produção de IFN-γ, CXCL-9, CXCL-10 e CCL2 foram avaliadas nos sobrenadantes de cultura pelo método imunoenzimático (ELISA) utilizando-se reagentes comercialmente disponíveis da BD OptEIA™. A leitura do aparelho foi feita usando o leitor de placas modelo Emax (Molecular Devices). Uma curva padrão foi utilizada para expressar os resultados em pg/ml.

VI.7 TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (TESTE DE MONTENEGRO) PARA O ANTÍGENO DE LEISHMANIA:

O teste *in vivo* foi realizado sempre após a coleta de sangue para o teste *in vitro*, com a finalidade de evitar a possível influência da reação do teste cutâneo na resposta imune determinada *in vitro*. O teste de Montenegro foi realizado utilizando antígeno solúvel de *L.braziliensis* como descrito anteriormente (Reed et al. 1986). A quantidade de 0,1 ml do antígeno foi injetada por via intradérmica no antebraço e após 48-72 horas o maior diâmetro da área de induração foi medido. A reação foi considerada positiva quando o diâmetro foi maior ou igual a 5 mm.

VI.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise da concordância entre a RM e a produção de IFN- γ foi realizada através do cálculo da estatística Kappa (κ) de acordo com intervalo de confiança de 95%. As características demográficas foram comparadas entre grupos de indivíduos, como segue: para as variáveis contínuas foi utilizada ANOVA de uma via. Quando o valor de P foi $<0,05$ foi realizado o pós-teste de pares de Bonferonni. O qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher foram utilizados para as variáveis categóricas. O teste T de Student foi utilizado para comparar as médias de duas distribuições normais, independentes, supondo que se trata de duas populações distintas. Para a análise de produção de IFN- γ e quimiocinas em culturas não estimuladas e estimuladas, o teste de Wilcoxon foi utilizado. As correlações foram realizadas pelo método de Spearman. Os softwares usados para as análises estatísticas foram o STATA versão 11 (College Station, TX) e GraphPad InsStat3 (La Jolla, CA).

VI.9. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

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

VII. RESULTADOS

VII.1. DETERMINAÇÃO DA EVIDÊNCIA DE EXPOSIÇÃO À INFECÇÃO POR *L.braziliensis*

Os dados relativos à estratégia de seleção e a identificação de familiares com evidência de exposição ao parasito baseado no teste de Montenegro e na produção de IFN- γ são mostrados na FIGURA 1. Após a identificação de 76 casos índices (pacientes com leishmaniose cutânea ativa ou pregressa), as residências foram visitadas sendo inicialmente realizada uma entrevista e o exame físico em 512 familiares dos casos índices. Nesta ocasião foram excluídos do estudo 204 indivíduos devido à história pregressa de leishmaniose e/ou evidência de cicatriz compatível com leishmaniose cutânea. Após a identificação dos 308 familiares sem história pregressa ou atual de leishmaniose cutânea, foi retirado sangue para avaliação de testes imunológicos *in vitro* e realizado a reação de Montenegro.

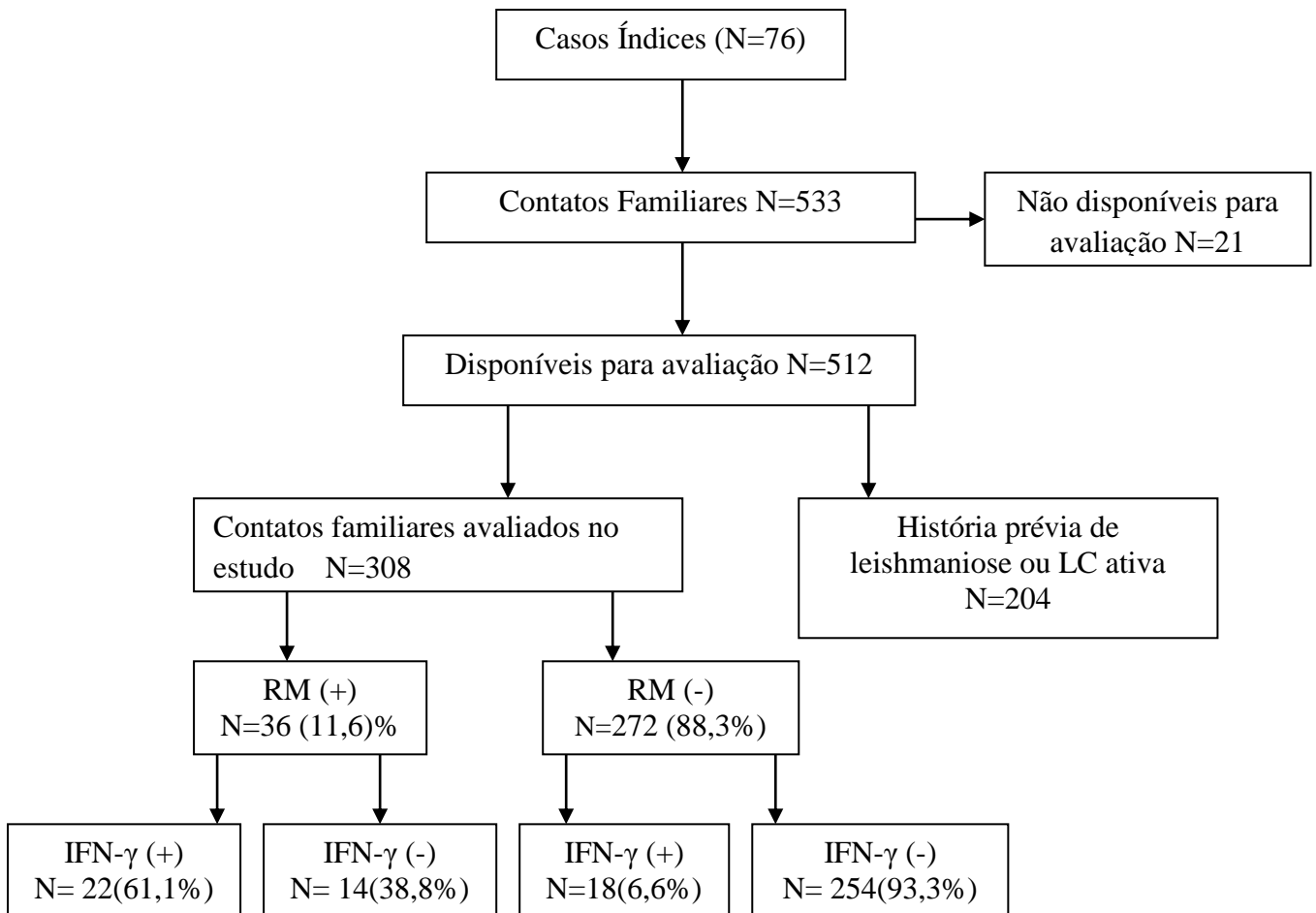


FIGURA 1. Seleção de familiares de pacientes com leishmaniose cutânea sem evidência de doença ativa ou progressa e frequência de indivíduos com evidência de resposta imune ao antígeno de leishmania.

Os familiares que apresentaram a reação de Montenegro positiva e/ou produção de IFN- γ específica para o antígeno de leishmania foram considerados como tendo evidência de resposta imune.

A reação de Montenegro positiva foi observada em 36 (11,6%) dos 308 contatos domiciliares testados. Neste grupo, em 22 indivíduos (61,1%) foi detectada a produção de IFN- γ . A reação de Montenegro foi negativa em 272 indivíduos (88,3%). Nesse grupo, 18 indivíduos (6,6%) apresentaram produção de IFN- γ . Baseando-se na reação de Montenegro e na produção de IFN- γ , 54 indivíduos (17,5%) apresentaram evidência de resposta imune.

Os 54 indivíduos com evidência de resposta imune foram divididos em 3 grupos: 22 indivíduos RM (+) IFN- γ (+), 14 indivíduos RM (+) IFN- γ (-) e 18 indivíduos RM (-) IFN- γ (+). Dos indivíduos sem evidência de resposta imune 51 foram selecionados para participar do grupo controle: RM (-) IFN- γ (-). Estes últimos indivíduos foram selecionados levando em consideração o local de moradia, sexo e idade.

VII.2. DADOS DEMOGRÁFICOS E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS CASOS ÍNDICES E DOS CONTATOS FAMILIARES COM OU SEM EVIDÊNCIA DE RESPOSTA IMUNE.

Com o objetivo de comparar os aspectos demográficos e epidemiológicos e melhor entender a dinâmica da transmissão da leishmaniose cutânea, os aspectos demográficos e epidemiológicos dos casos índices e contatos domiciliares com e sem evidência de resposta imune foram obtidos e são apresentados na TABELA 1.

TABELA 1: Aspectos epidemiológicos dos pacientes com leishmaniose cutânea e de familiares residentes na mesma casa com ou sem evidência de resposta imune ao antígeno de leishmania.

Variáveis	Casos Índices -LC (N=76)	Contatos da mesma moradia com evidência de resposta Imune (N=54)	Contatos da mesma moradia sem evidência de resposta Imune (N=254)	Valor de P
Idade (anos)	22.7 ± 15.0 ^a	23.1 ± 15,5 ^b	16.8 ± 11,7 ^{a, b}	0,001*
Sexo (% homens)	41 (54,0)	28 (51,8)	123 (48,4)	0,67 **
Ocupação, N (%)				
- Agricultor	17 (22,4)	10 (18,5)	52 (20,5)	0,058 **
- Doméstica	27 (35,5)	19 (35,2)	56 (22,0)	
- Estudante/Outros	32 (42,1)	25 (46,3)	146 (57,5)	
Anos na área endêmica	21,7±14,8 ^c	22.7 ± 15,0 ^d	16,4 ± 11,4 ^{c, d}	0,002*
Anos na mesma casa	12,7±11,4 ^e	14,6 ± 14,3 ^f	9,1 ± 6,9 ^{e, f}	0,001*
Chegada após as 16h, N (%)	63 (82,9)	45 (83,3)	208 (81,9)	0,96 **

Valores com sobrescritos idênticos são significativamente diferentes. Testes estatísticos e valores de p estão abaixo:

Valores de P para o teste de pares de Bonferroni: a = 0,002, b = 0,004, c = 0,005, d = 0,003, e = 0,009, f <0,001;

* one-way ANOVA;

** Teste do qui-quadrado

Como mostrado na tabela acima, não houve diferença entre os casos índices e contatos familiares com evidências de resposta imune em todas as variáveis analisadas (idade, sexo, ocupação, anos morando na área, bem como tempo de moradia na mesma casa). No entanto foram encontradas diferenças entre os casos ou índices e os contatos domiciliares com e sem evidências de exposição à infecção por leishmania em relação à idade, ocupação, tempo

de residência na área endêmica e tempo de residência na mesma casa. Contatos domiciliares sem evidências de resposta imune eram mais jovens ($16,8 \pm 11,7$), a maioria eram estudantes (57,5%) e tinham menos tempo vivendo na mesma casa ($16,4 \pm 11,4$) e na mesma área endêmica ($9,1 \pm 6,9$) do que pacientes com leishmaniose cutânea pregressa e contatos domiciliares com evidência de resposta imune.

VII.3. CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE IFN- γ E O TESTE DE MONTENEGRO

Para avaliar a concordância entre o teste de Montenegro e a produção de IFN- γ , foi realizado o teste de concordância entre os indivíduos com evidência de resposta imune (N=54). Foi observado que 61,1% dos contatos familiares foram positivos para ambos os testes e 82,5% apresentaram resultados negativos para ambos os testes. Houve também, uma concordância moderada (teste de concordância Kappa: 0,49 (95% IC: 0.34-0.64). Adicionalmente, foi observada uma correlação direta entre o tamanho da reação de Montenegro e a produção de IFN- γ ($p < 0,0001$; $r = 0,50$). (FIGURA 2)

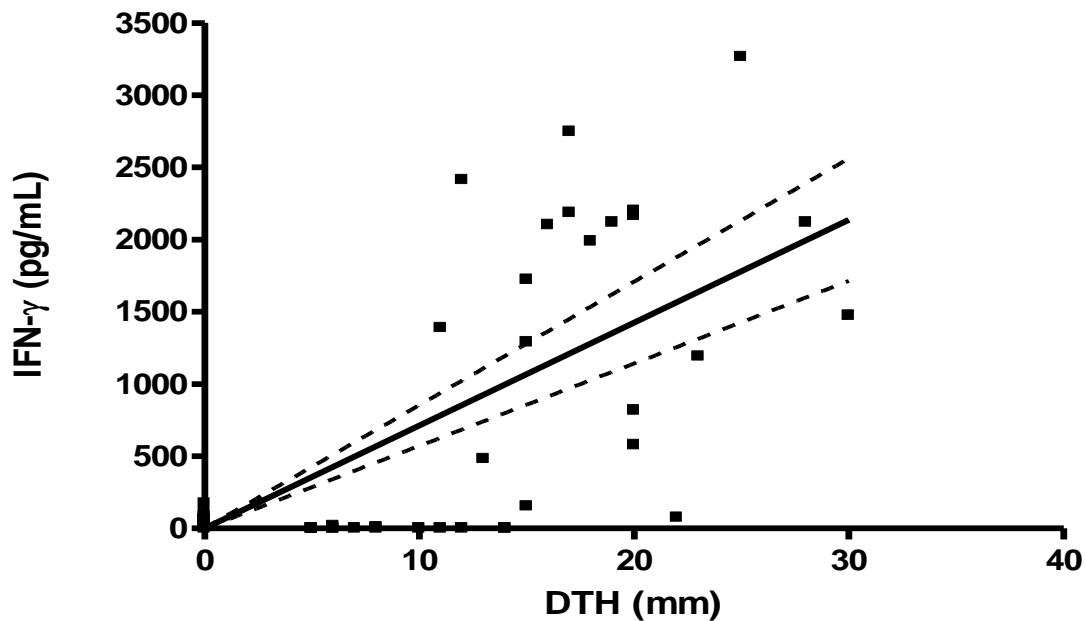


FIGURA 2: Correlação entre a produção de IFN- γ o teste de Montenegro em contatos domiciliares de pacientes com LC. Correlação entre a produção de IFN- γ (pg/ml) e o tamanho do RM (mm) foi avaliada em 54 familiares que apresentaram evidência de resposta imune. Foi utilizada a correlação de Spearman através do programa GraphPad Instat 3.

VII.4 PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS EM INDIVÍDUOS COM E SEM EVIDÊNCIA DE RESPOSTA IMUNE.

Como as quimiocinas são produzidas no início da infecção por leishmania e participam da resposta imune ativando e recrutando neutrófilos, monócitos e células T para o local da infecção, foi determinada a produção de CCL2, CXCL9 e CXCL10 nos indivíduos com evidências de resposta imune (N = 54) e no grupo controle (N = 51) (TABELA 2).

TABELA 2: Produção de quimiocinas em contatos domiciliares com e sem evidência de resposta imune ao antígeno de leishmania.

	Contatos familiares com evidência de resposta imune (N=54)	Contatos familiares sem evidência de resposta imune (N=51)	Valor de P
Idade (anos)	23.1 +/- 15.5	22.8 +/- 16.1	0.91*
Sexo (% masculino)	28 (51.8)	24 (47.1)	0.62**
CXCL9 (Meio)***	2528 (1588; 5822)	923 (456; 2569)	< 0.001†
CXCL9 (Ag)***	9190 (2744; 54675)	1316 (580; 3243)	< 0.001†
CXCL10 (Meio)***	0 (0; 317)	290 (0; 645)	< 0.001†
CXCL10 (Ag)***	1376,5 (0; 28259)	621 (193; 1894)	0.012†
CCL2 (Meio)***	11000 (6440 ; 22920)	11220 (4920; 28960)	0.96†
CCL2 (Ag)***	30550 (15900; 38540)	12620 (5400 ; 28720)	< 0.01†

* Teste t de Student;

** Teste chi-quadrado de Pearson;

*** Resultados expressos com o valor da mediana (intervalo interquartil) pg/mL;

† Wilcoxon rank-sum test

Ao fazer a comparação entre os contatos familiares com evidência de resposta imune e sem evidência de resposta imune não foi encontrada significância estatística com relação à idade nem ao sexo dos indivíduos.

A produção espontânea (meio) de CXCL9 nos contatos familiares com evidência de resposta imune foi maior do que a observada no grupo controle ($p < 0.001$). Entretanto, em relação à produção espontânea de CXCL10, esta foi maior no grupo controle ($p < 0.001$). Nas culturas estimuladas com antígeno de leishmania, a produção de CXCL10, CCL2 e CXCL9 foram maiores no grupo de indivíduos com evidência de resposta imune quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente).

VII.5 PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS EM CULTURAS SEM ESTÍMULO E COM ESTÍMULO COM ANTÍGENO SOLÚVEL DE LEISHMANIA NOS DIFERENTES GRUPOS.

Com a finalidade de avaliar se a produção de quimiocinas estava associada com a positividade da RM e a capacidade de produzir IFN- γ , os 105 contatos familiares que tiveram as quimiocinas determinadas foram divididos em 4 grupos: **1)** contatos familiares com RM(+) IFN-y(+); **2)** RM(+) IFN-y(-); **3)** RM (-)IFN-y(+); e **4)** RM(-)IFN-y(-).

A produção de CXCL9, CXCL10 e CCL2 espontânea e em cultura estimuladas com antígeno solúvel de leishmania nesses grupos é apresentada nas FIGURAS 3, 4 e 5.

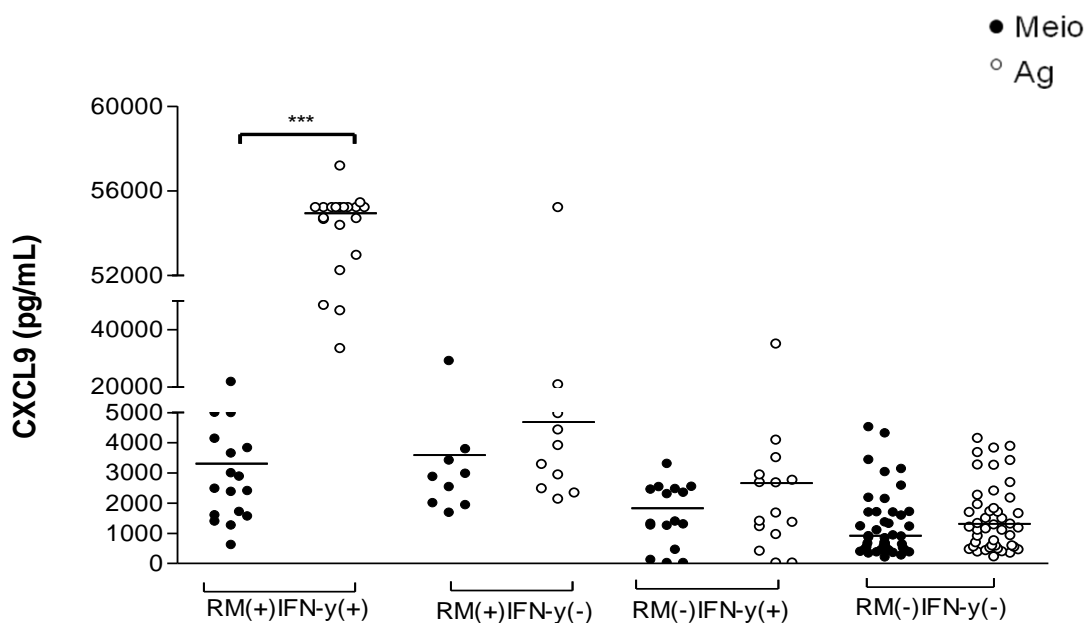


FIGURA 3. Produção de CXCL9 nos diferentes grupos (N= 105). Células do sangue total foram estimuladas ou não com antígeno de leishmania. A dosagem da quimiocina foi realizada após 72 horas de cultura através da técnica de ELISA. Os valores que são estatisticamente diferentes são indicados como : *** $p < 0,0001$; Teste de Wilcoxon; GraphPad Prism 4.

Foi observado um aumento na produção de CXCL9 em culturas estimuladas com SLA em indivíduos que apresentavam uma produção de IFN- γ e que tinham uma RM positivo (grupo 1). Esses dados sugerem que uma positividade para ambos os testes é requerida para uma alta produção de CXLC9 em culturas estimuladas com antígeno solúvel de leishmania.

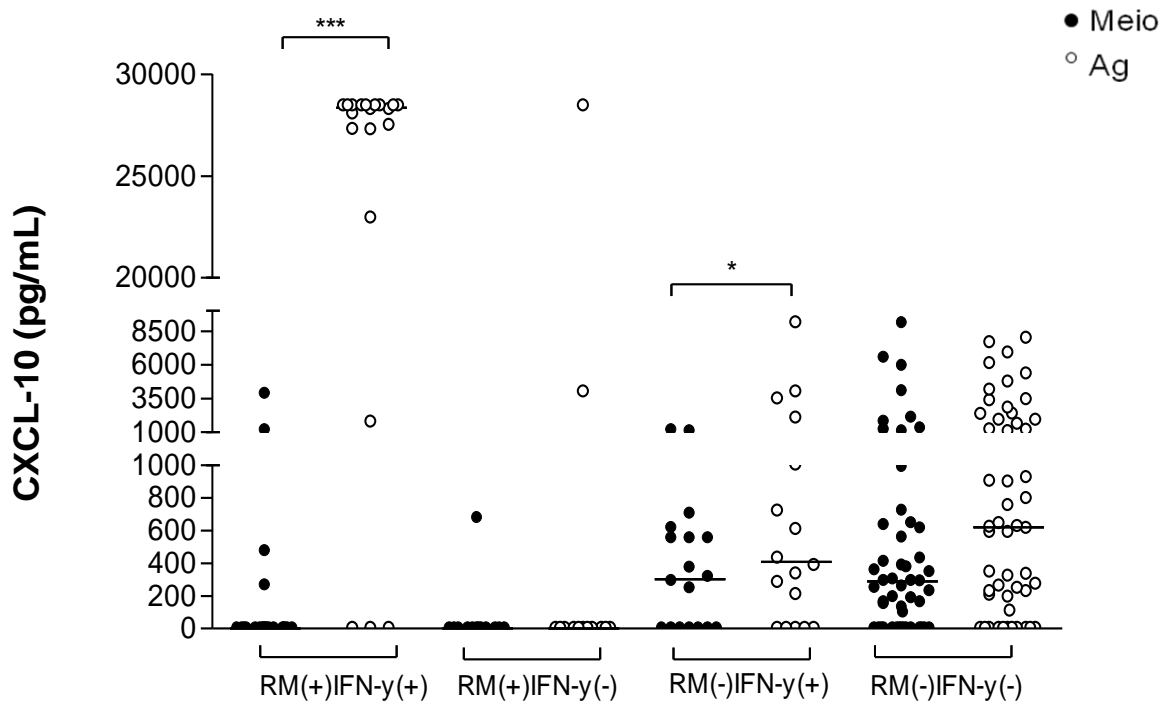


FIGURA 4: Produção de CXCL-10 nos diferentes grupos (n= 105). Células do sangue total foram estimuladas ou não com antígeno de leishmania. A dosagem da quimiocina foi realizada após 72 horas de cultura através da técnica de ELISA. Os valores que são estatisticamente diferentes são indicados como : *** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$; Teste de Wilcoxon; GraphPad Prism 4.

Nos indivíduos com um RM (+) e produção de IFN- γ (+) e nos indivíduos somente com produção de IFN- γ (+) (grupos 1 e 3 respectivamente) foi observada uma grande produção de CXCL10 em culturas estimuladas quando comparada com culturas não estimuladas. Entretanto, no grupo 2 (só com RM positivo) a produção dessa quimiocina foi baixa ou ausente.

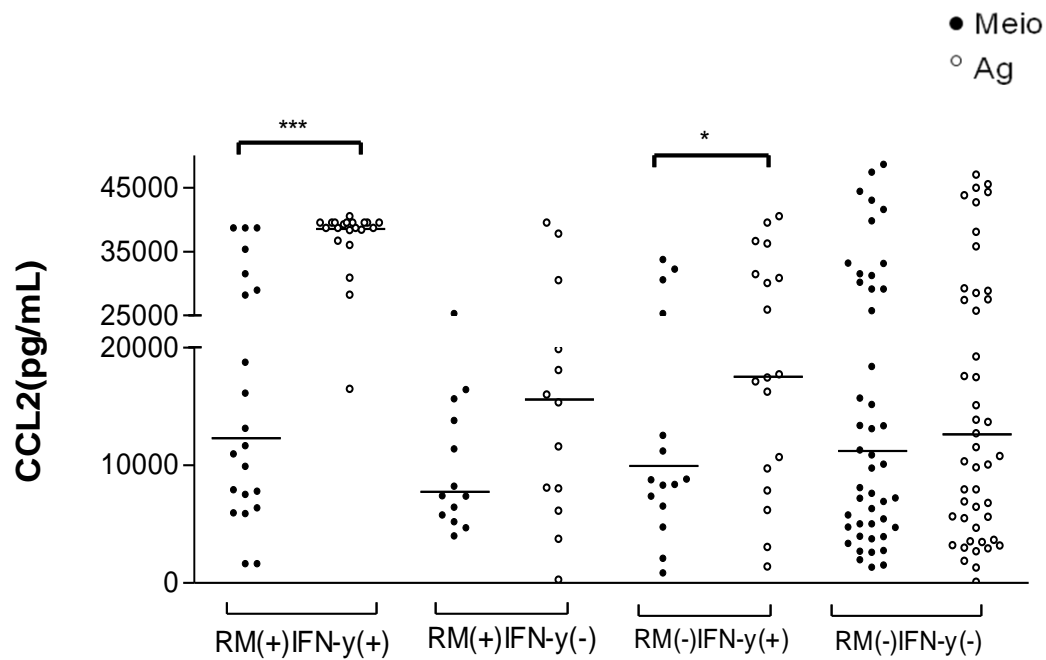


FIGURA 5. Produção de CCL2 nos diferentes grupos. Células do sangue total foram estimuladas ou não com antígeno de leishmania. A dosagem da quimiocina foi realizada após 72 horas de cultura através da técnica de ELISA. Os valores que são estatisticamente diferentes são indicados como: *** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$; Teste de Wilcoxon; GraphPad Prism 4.

A concentração de CCL2 foi aumentada nos grupos 1 e 3 com relação aos outros grupos. Entretanto, uma alta produção dessa quimiocina nos indivíduos sem evidência de resposta imune (grupo 4) e a sua alta produção espontânea (meio) em todos os grupos limita correlacionar a produção desta quimiocina com a evidência de resposta imune com a reação de Montenegro ou com a produção de IFN- γ .

Dados não mostrados apontam o 1º grupo (RM+IFN- γ +) como maior produtor de quimiocinas (CCL2, CXCL9 e CXCL10) do que os outros 3 grupos.

VII. 6 CORRELAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO DE IFN- γ E PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS.

Para avaliar se a produção de IFN- γ poderia estar associada à produção de CCL2, CXCL9 e CXCL10, foi realizado o teste de correlação de Spearman (Figura 6, 7 e 8). Os valores mostrados nos gráficos são equivalentes aos dados de subtração das culturas estimuladas com antígenos de leishmania menos os valores das culturas não estimuladas.

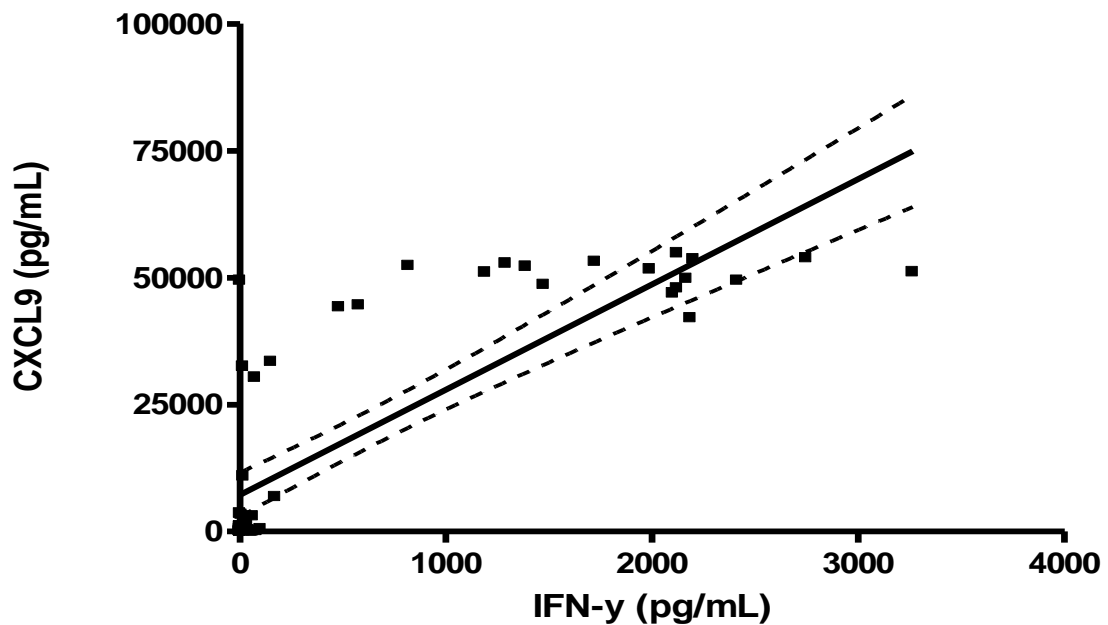


FIGURA 6: Correlação entre a produção de IFN- γ e CXCL9. Correlação entre a produção de IFN- γ (pg/ml) e a produção de CXCL9 (pg/ml) foi avaliada em 54 familiares que apresentaram evidência de resposta imune. Foi utilizada a correlação de Spearman utilizando-se o programa GraphPad InStat 3 ($p < 0,0001$; $r = 0,72$).

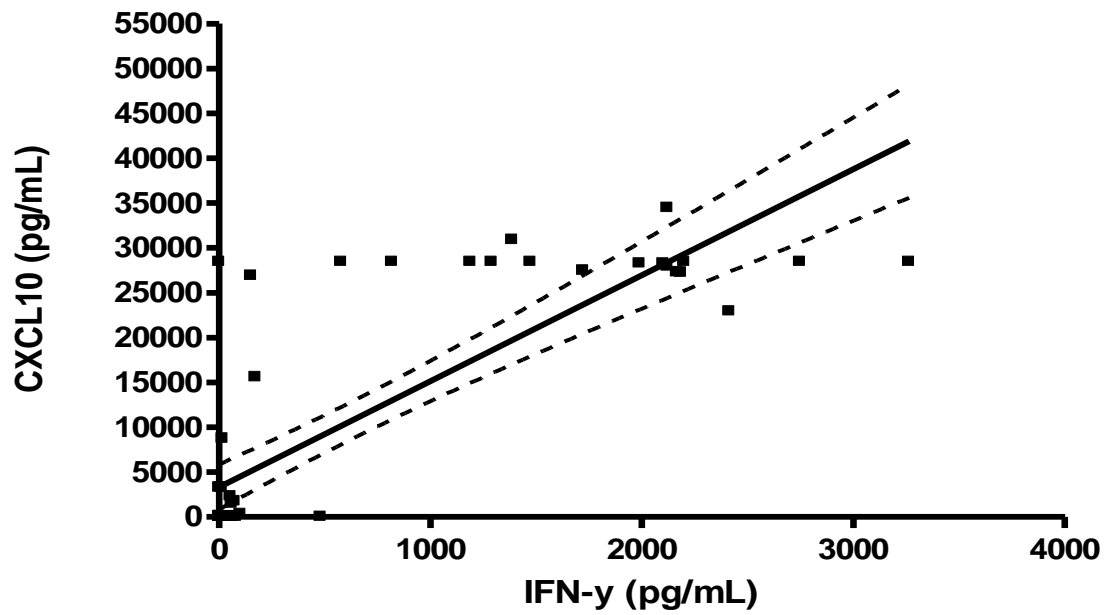


FIGURA 7: Correlação entre a produção de IFN- γ e CXCL10. Correlação entre a produção de IFN- γ (pg/ml) e a produção de CXCL10 (pg/ml) foi avaliada em 54 familiares que apresentaram evidência de resposta imune. Foi utilizada a correlação de Spearman utilizando-se o programa GraphPad Instat 3 ($p < 0,0001$; $r = 0,74$).

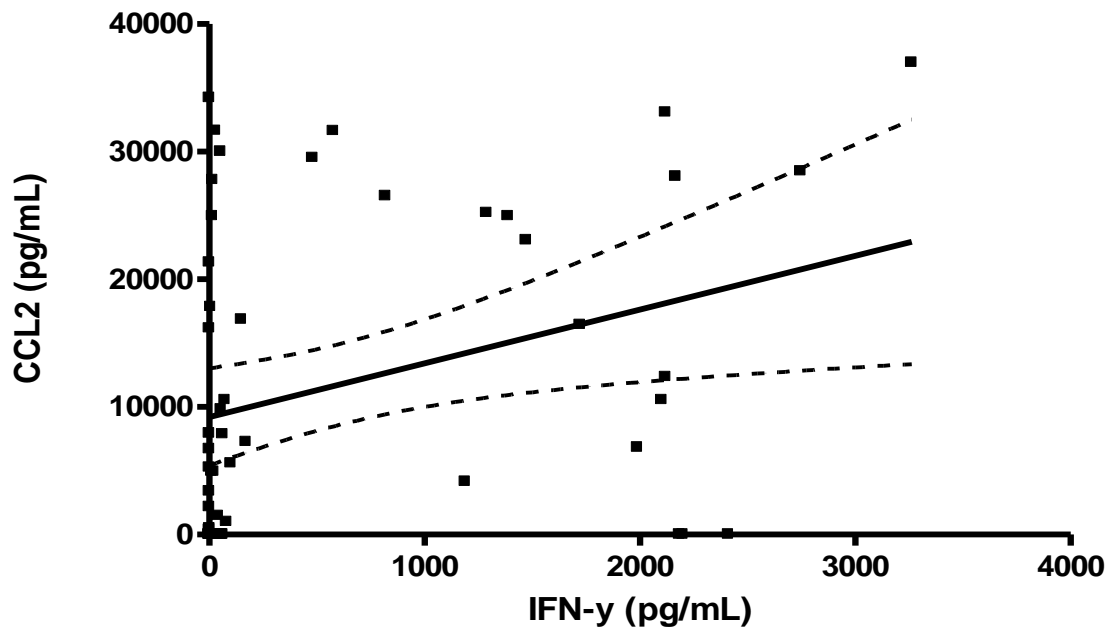


FIGURA 8: Correlação entre a produção de IFN- γ e CCL2. Correlação entre a produção de IFN- γ (pg/ml) e a produção de CCL2 (pg/ml) foi avaliada em 54 familiares que apresentaram evidência de resposta imune. Foi utilizada a correlação de Spearman utilizando-se o programa GraphPad InStat 3 ($p < 0,05$; $r = 0,30$).

Foi observada uma correlação positiva entre a produção de IFN- γ e a produção de todas as quimiocinas testadas. Todavia, esta correlação foi mais forte com relação à produção de IFN- γ e CXCL9 e a produção de IFN- γ e CXCL10.

VIII. DISCUSSÃO

Estudos imunoepidemiológicos na leishmaniose tegumentar americana têm tido como objetivo determinar a influência de fatores do hospedeiro, parasito, e aspectos ambientais no desenvolvimento das diferentes formas clínicas de leishmaniose (Sher et al. 1983; Da-Cruz et al. 2002; Follador et al, 2002; Schriefer et al, 2004; Convit et al, 2005; Novoa et al. 2011). A leishmaniose cutânea é a principal forma clínica da infecção pela *L. braziliensis* mas, em áreas de transmissão de *L. braziliensis* tem sido documentado, baseado no teste cutâneo de hipersensibilidade tardia, que mais de 10% dos indivíduos residentes nestas localidades tem evidência de exposição a antígeno de leishmania (Davies et al. 1995; Follador et al. 2002). Este dado indica que a exemplo do que ocorre em outras doenças infecciosas e parasitárias, uma grande parte dos indivíduos infectados pela *L. braziliensis* tem a capacidade de controlar a infecção e não desenvolver doença. Por esta razão, o estudo da resposta imune em indivíduos que não desenvolvem a doença aparente, consiste em uma boa forma de entender os mecanismos imunológicos de proteção contra infecção. Atualmente a documentação de uma reação de Montenegro positiva na ausência de história atual ou passada de LC é o único teste que tem sido utilizado para identificar indivíduos que têm a forma subclínica da infecção por *L. braziliensis* (Follador et al. 2002). No presente estudo foi documentado que a determinação da produção de IFN- γ em adição ao teste *in vivo* de hipersensibilidade tardia aumenta o limiar de detecção de exposição à *L. braziliensis*. Foi também observado a existência de resultados discordantes entre a reação de Montenegro e a produção *in vitro* de IFN- γ . Adicionalmente, a análise da produção de quimiocinas principalmente no que se refere à CXCL9 e CXCL10 sugerem que células diferentes do sistema imune podem estar relacionadas com estes dois testes, ou seja, estas quimiocinas podem estar sendo produzidas por células que não estejam participando da resposta ao teste de hipersensibilidade tardia.

O presente estudo foi realizado em familiares de indivíduos com leishmaniose cutânea e teve como desfecho primário identificar, baseado em teste imunológicos, indivíduos expostos à infecção por leishmania. Desde que foram excluídos de participação no estudo familiares dos casos índices que tinham história atual ou pregressa de leishmaniose, a documentação de resposta imune a antígeno de leishmania nestes familiares, pode ser considerada como evidência de exposição ao parasito. Todavia, uma importante limitação deste trabalho é que nós não podemos ter certeza quando a exposição à leishmania aconteceu. Entretanto, a análise comparativa entre as características demográficas dos casos índices e dos contatos domiciliares com e sem evidência de resposta imune, apóiam a hipótese de que a exposição à leishmania nessa população ocorreu perto do período que os casos índices adquiriram a doença. A ocorrência de uma possível menor exposição ao mosquito transmissor da leishmaniose pode explicar as diferenças que foram encontradas entre os contatos domiciliares com e sem evidências de exposição à infecção por leishmania em relação à idade, ocupação, tempo vivido na área endêmica e tempo vivido na mesma casa.

Os testes de hipersensibilidade tardia e a avaliação *in vitro* da resposta imune determinada pela proliferação de linfócitos ou produção de citocinas frente a antígenos, têm sido amplamente utilizados para determinar evidência da ocorrência de resposta imune mediada por células (Sassi et al. 1999; Mascarenhas et al. 2006; Bittar et al. 2007; Gomes-Silva et al. 2007; Machado et al. 2009). Esses testes têm boa concordância embora os testes *in vitro* sejam considerados mais sensíveis do que o teste *in vivo*. Em pacientes com LC, bem como em pacientes com leishmaniose mucosa infectados por *L. braziliensis* há uma forte associação entre a positividade da reação de Montenegro e a produção de IFN- γ , bem como evidência de resposta linfocitária proliferativa ao estímulo do parasito (Carvalho et al. 1985; Sassi et al. 1999; Da-Cruz et al, 2002; Antonelli et al. 2004). Por causa do alto valor preditivo (Cuba et al 1984; Davies et al. 1995) da reação de Montenegro no diagnóstico da

leishmaniose tegumentar, este teste também tem sido amplamente utilizado para identificar exposição à infecção por leishmania entre os indivíduos saudáveis que vivem em áreas de transmissão de *Leishmania* (Davies, 1995; Follador, 2002). Na tuberculose, Salinas et al. (2011) mostraram haver concordância entre os testes *in vivo* e *in vitro* e propuseram ainda que o teste Quantiferon, que é um teste para diagnóstico *in vitro* que utiliza um cocktail de peptídeos do *M. tuberculosis* e cujo a produção de IFN- γ é determinado no sangue total heparinizado, substituísse o teste tuberculínico. Todavia, estudos recentes comparando o Quantiferon com o teste tuberculínico em indivíduos com tuberculose latente tem mostrado discordância entre estes testes. Embora a utilização de testes semelhantes ao Quantiferon não seja uma prática corrente na leishmaniose esse teste tem sido empregado experimentalmente. As vantagens de se utilizar o Quantiferon em vez do teste de hipersensibilidade tardia é que neste método de detecção de resposta imune não há a necessidade de uma segunda visita para leitura do teste intradérmico e também evita viés na interpretação dos resultados.

Vários trabalhos mostram que o teste de hipersensibilidade tardia é o principal método para diagnóstico da infecção por *L. braziliensis* em zona rural de áreas endêmicas de leishmaniose. Porém, alguns trabalhos mostram que, adicionalmente à reação de Montenegro, outros testes podem ser utilizados, como a pesquisa direta de *Leishmania* e o ensaio de imunofluorescência indireta (Curti et al. 2011). Alguns autores sugerem que para a identificação adequada dos casos de leishmaniose tegumentar americana seria necessário a combinação métodos diagnósticos que associem o teste de Montenegro com pelo menos um outro teste.

Nós mostramos previamente que indivíduos com um teste intradérmico positivo, mas sem doença apresentaram uma menor produção de IFN- γ em culturas estimuladas com antígeno de leishmania quando comparados com pacientes com leishmaniose cutânea e ainda em alguns deles, quantidades detectáveis de IFN- γ não foram encontrados em sobrenadantes

de cultura de linfócitos estimulados com antígeno de leishmania (Follador et al. 2002; Novoa et al. 2011). Desta forma a ausência de concordância entre esses testes já tinha sido documentada em indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis*. No presente estudo, foi ampliada a evidência de uma concordância não muito forte entre estes dois testes. Além de mostrar que contatos domiciliares que têm uma reação de Montenegro positiva podem não produzir IFN- γ quando estimulados com antígeno de leishmania, foi também documentado que produção de IFN- γ pode ser observada em indivíduos com uma reação de Montenegro negativa. Discordância entre a reação intradérmica e a produção de IFN- γ têm sido observada em contatos domiciliares de pacientes com tuberculose que tem tuberculose latente (Ozturk et al. 2007; Machado et al. 2009; Delgado et al. 2011) assim como em indivíduos saudáveis não contactantes (Mahomed et al. 2006).

Vários fatores podem explicar a concordância moderada observada entre a hipersensibilidade tardia e a produção de IFN- γ *in vitro*: 1) Presença de fatores supressores *in vivo* que impedem a documentação de hipersensibilidade tardia; 2) Produção de IFN- γ por células não T; 3) Falta de células efectoras de memória no sangue periférico, mas presença de células T de memória em linfonodos ou outros tecidos.

Discordância entre hipersensibilidade tardia e testes *in vitro* foram documentadas em pacientes com tuberculose ativa bem como em indivíduos infectados por *L. chagasi* (Carvalho et al. 1992; Detjen 2009). Nestes casos a ocorrência de desnutrição assim como a presença de fatores supressores solúveis podem explicar a ausência de resposta *in vivo*, na presença de resposta *in vitro*. Em indivíduos infectados com *L. chagasi* e em pacientes com tuberculose geralmente a restauração do teste de hipersensibilidade tardia ocorre após terapia específica ou com a melhora do estado nutricional (Cerf et al. 1987; Yoneda et al. 1989).

Respostas de hipersensibilidade tardias significativamente diminuídas, incluindo a reatividade ao PPD foram observadas em crianças/adolescentes infectados pelo HIV-1

comparadas com controles saudáveis, provavelmente refletindo doença avançada e supressão da imunidade mediada por células T (Costa et al. 2011). Neste trabalho não foi feita triagem para diagnosticar imunossupressão seja por infecção por HIV, leucemia ou linfoma ou se o indivíduo tomava algum tipo de droga imunossupressora. Todavia, todos os indivíduos eram hígidos e apresentavam bom estado nutricional.

Evidências de que o IFN- γ pode ser produzido por outras células, em vez de células T têm sido documentadas (Venuprasad et al. 2003). Em tal caso, uma das fontes de IFN- γ pode ser a célula NK (Scharton & Scott, 1993; Maasho et al. 1998). Na Etiópia foi observado que contatos de pacientes com leishmaniose cutânea que apresentavam resposta imune a antígeno de leishmania, a célula produtora de IFN- γ foi a célula NK. (Maasho et al. 1998). Com relação à memória, estudo em modelo experimental de leishmaniose mostrou que após o controle da infecção por *L. major*, células efetoras de memória podem não ser encontradas, mas os animais continuam com as células T de memória central (Scott, 2005). A produção de IFN- γ em paciente com leishmaniose cutânea é realizada predominantemente por células T efetoras de memória ou células T efetoras (Antonelli et al. 2004). No entanto, o desaparecimento destas células do sangue periférico pode fazer o teste *in vitro* se tornar negativo. Como nos testes de hipersensibilidade tardia antígenos são inoculados intradermicamente e a resposta imune é avaliada 48 a 72 horas após o teste, há tempo para as células T efetoras de memória presentes nos linfonodos ou em outros tecidos, migrarem para o local da infecção e reagir *in vivo* ao antígeno de leishmania. Como os participantes desse estudo são saudáveis, não apresentavam sinais visíveis de desnutrição, e provavelmente foram expostos à *L. braziliensis* baseado nos dados epidemiológicos, a explicação mais provável para a concordância moderada observada entre a RM e a produção de IFN- γ nos indivíduos com teste de hipersensibilidade tardia negativo e IFN- γ positivo é a produção de IFN- γ por células não T. Apóia esta hipótese a observação de que o aumento da produção de CXCL10 e

CCL2 em culturas estimuladas com *L. braziliensis* está associada predominantemente com a produção de IFN- γ e não com o teste de Montenegro positivo. Mas, no caso da CCL2, devido à alta produção espontânea, esta quimiocina não pode ser utilizada como marcador de evidência de resposta imune ao antígeno de leishmania. Diferentes tipos celulares como os neutrófilos, células NK e células NKT e células T podem produzir IFN- γ (Chen & Paul, 1997; Maasho et al. 1998; Venuprasad et al. 2003; Antonelli et al. 2005) e estudos futuros irão abordar esse assunto.

A estratificação dos testes em quatro grupos distintos de resposta imune e a identificação de marcadores imunológicos associados com a proteção contra a infecção por *L. braziliensis*, só poderão ser avaliados como preditores de risco para a doença ativa no futuro quando houver um número maior de doentes. Até a presente data dos 308 indivíduos avaliados 29 (9,4%) adoeceram. Durante quatro anos todos os indivíduos pertencentes a este estudo serão acompanhados a fim de avaliar o desfecho clínico da doença.

Este estudo mostra que na leishmaniose tegumentar a documentação de exposição ao antígeno de leishmania deve ser avaliada por pelo menos dois testes. Primeiro, porque aumenta a evidência de exposição à infecção por leishmania de 11,7% (conforme documentado pelo teste intradérmico) para 17%, quando a reação de Montenegro ou IFN- γ foram positivos. Além disso, é destacado o fato que em adição a resposta imune adaptativa, outros fatores relacionados com a resposta imune inata precisam ser estudados para identificar os fatores imunológicos relevantes que são associados com a proteção contra a infecção por *L. braziliensis*.

IX. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

- Dar seguimento a coorte com o objetivo de avaliar a associação entre resposta imune (reação de Montenegro, produção de IFN- γ , produção de quimiocinas e outras citocinas) com evolução de infecção para a cura ou desenvolvimento da doença.

X. CONCLUSÕES

1. A documentação de exposição ao parasito na infecção por *L. braziliensis* deve ser avaliada por pelo menos dois testes (RM e produção de IFN- γ em culturas estimuladas com antígeno solúvel de leishmania);

2. Os resultados com relação à produção de quimiocinas sugerem que em um sub-grupo de indivíduos expostos à infecção por *L. braziliensis* a produção de IFN- γ e de CXCL10 é feita por células não envolvidas com a reação de hipersensibilidade tardia.

XI. SUMMARY

CHARACTERIZATION OF THE IMMUNE RESPONSE OF HOUSEHOLD CONTACTS OF PATIENTS WITH LEISHMANIASIS RESIDENTS IN AN ENDEMIC AREA OF TRANSMISSION OF *Leishmania braziliensis*. Introduction: From an immunology point of view, cutaneous leishmaniasis (CL) is characterized by an exaggerated production of IFN- γ and a positive antigen-specific delayed hypersensitivity test to the parasite antigen (Montenegro reaction). This test is used to diagnose the disease and for determining exposure to antigens of the parasite even in the absence of the disease. About 10% of healthy individuals living in an area of *L. braziliensis* transmission respond to the Montenegro Reaction (MR), even without showing symptoms of the disease. Objective: Identify household contacts (HC) of patients with cutaneous leishmaniasis who are without signs of previous or active disease from *L. braziliensis* exposure and evaluate the immune response in these individuals. Materials and Methods: The study includes 308 HC of patients with CL residents in an endemic area of transmission of *L. braziliensis* in Bahia, Brazil. Production of IFN- γ antigen specific was evaluated in whole blood by ELISA assay and subsequently, the MR was performed. Evidence of immune response was based on a positive result in the RM test and/or *in vitro* IFN- γ production in cultures stimulated with leishmania antigen. We also evaluate the production of CXCL9, CXCL10 and CCL2 by ELISA. Results: Evidence of immune response was observed in 54 (17.5%) of the 308 HC evaluated. Specifically, 36 (11.6%) household members had positive MR and 40 (12.9%) produced IFN- γ . However, in 36 HC individuals with positive MR, IFN- γ was found in only 22 (61.1%) and in the 40 individuals that produced IFN- γ , 22 (55%) were had a positive MR. Although there is a correlation between RM and IFN- γ ($p < 0.0001$), only a moderate agreement between the IFN- γ and RM ($\kappa = 0.49$) in concordance analysis was observed. Individuals with evidence of immune response produced more CXCL9, CXCL10 and CCL2 than individuals with no evidence of immune response. Furthermore, a direct correlation between IFN- γ production and MR size with chemokine production was observed. Although MR should be considered a marker of infection by *L. braziliensis*, a high percentage of individuals with a negative reaction produced chemokines and IFN- γ . Conclusion: More than one test should be used for the identification of exposure to *L. braziliensis*. In addition to MR, evaluation of the IFN- γ should be performed. Additionally, chemokines can be used as a marker of exposure to *L. braziliensis*.

Keywords: 1. Cutaneous leishmaniasis; 2. *L. braziliensis* infection; 3. Montenegro Reaction;
4. Chemokines.

XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antonelli, L.R.V.; Dutra, W.O.; Almeida, R. P.; Bacellar, O.; Gollob, K.J.; Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clinical & Experimental Immunology*, 2004; 136:341–348

_____ ; Dutra, W.O.; Almeida, R.P.; Bacellar, O.; Carvalho, E.M.; Gollob, K.J.; Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology Letters*. 2005, 101:226-230.

Bacellar, O.; Lessa, H.; Schriefer, A.; Machado, P; Jesus, A.R.; Dutra, W. O.; Gollob, K.J.; Carvalho, E.M.; Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. *Infection and Immunity*.; Vol. 70, No. 12; Dec. 2002, p. 6734–6740.

Bittar, R.C.; Nogueira, R.S.; Vieira-Gonçalves, R., Pinho-Ribeiro, V.; Mattos, M.S.; Oliveira-Neto, M.P.; Coutinho, S.G.; Da-Cruz, A.M. T-cell responses associated with resistance to leishmania infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*; *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 102(5): 625-630, August 2007.

Bomfim, G.; Nascimento, C.; Costa, J.; Carvalho, E.M.; Barral-Netto, M.; Barral, A.; Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*. 1996 Nov;84(2):188-94.

Brandonisio, O.; Panaro, M.A.; Fumarola, L.; Sisto, M.; Leogrande, D.; Acquafredda, A.; Spinelli, R.; Mitolo, V.; Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 α induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clinical Experimental Medicine* (2002) 2:125–129.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007.180 p. : il. – (Serie A. Normas e Manuais Técnicos).

Carvalho, E. M.; Badaró, R.; Reed, S.G.; Jones, T.C.; Johnson, W.D. Jr.; Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation*. 1985 December; 76(6): 2066–2069.

_____ ; Johnson, W. D.; Barreto, E.; Marsden, P. D.; Costa, J. L.; Reed, S.; Rocha, H.; 1985. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Journal of Immunology*. 135:4144–4148.

_____ ; Barral, A.; Pedral-Sampaio, D.; Barral-Netto, M.; Badaró, R.; Rocha, H.; Johnson, W.D. Jr.; Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *Journal of Infectious Diseases*. 1992 Mar;165(3):535-40.

_____ ; Bacellar, O.; Brownell, C.; Regis, T.; Coffman, R.L.; Reed, C.G.; Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology*. 1994,152:5949–5956.

Camera, P.O.; Jungera, J.; Pires, F.E.S.S.; Mattos, M.; Oliveira-Neto, M.P.; Fernandes, O.; Pirmez, C.; Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (2006) 100, 1112—1117.

Castellucci, L.; Cheng, L.H.; Araújo C.; Guimarães, L.H.; Lessa, H.; Machado, P.; Almeida, M.F.; Oliveira, A.; Ko, A.; Johnson, W.D.; Wilson, M.E.; Carvalho, E.M.; Jesus, A.R.; Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(1), 2005, pp. 69–73.

Cerf, B.J.; Jones, T.C.; Badaro, R.; Sampaio, D.; Teixeira, R.; Johnson, W.D. Jr.; Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. 1987 Dec;156(6):1030-3.

Chen, H.; Paul, W.E.; Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. *Journal of Immunology*. 1997, Sep 1;159(5):2240-9.

Convit, J.; Ulrich, M.; Pérez, M.; Hung, J.; Castillo, J.; Rojas, H.; Viquez, A.; Araya, L.N.; De Lima, H.; Atypical cutaneous leishmaniasis in Central America: possible interaction between infectious and environmental elements. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (2005) 99, 13—17.

Costa, N.M.X.; Albuquerque, M.; Lins, J.B.A.; Alvares-Junior, J.T.; Stefani, M.M.A.S.; Delayed-type hypersensitivity skin test responses to PPD and other antigens among CG-vaccinated HIV-1-infected and healthy children and adolescents. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011; Oct ;44(5):542-5.

Cuba, C.A.C.; Llanos-Cuentas, E.A.; Barreto, A.C.; Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil: an area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. I. Laboratory diagnosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1984; 17:161–7.

Curti, N.C.M.; Silveira, T.G.V.; Arraes, S.M.A.A.; Bertolini, D.A.; Zanzarini, P.D.; Venazzi, E.A.S.; Fernandes, A.C.S.; Teixeira, J.J.V.; Lonardon, M.V.C.; Epidemiological and clinical characteristics of cutaneous leishmaniasis and their relationship with the laboratory data, south of Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2011; 15(1):12-16.

Da-Cruz, A.M.; Bittar, R.; Mattos, M.; Oliveira-Neto, M.P.; Nogueira, R.; Pinho-Ribeiro, V.; Azeredo-Coutinho, R.B.; Coutinho, S.G.; T-Cell-Mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*. Mar. 2002, Vol.9, Nº2, p. 251–256.

Davies, C.R.; Llanos-Cuentas, E.A.; Pyke, S.D.M.; Dye, C; Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. *Epidemiology & Infection*. 1995, 114: 297-318.

Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 27:305-318.

Delgado, N.J.; Castells, C.C.; García, C.M.Á.; Sáez, L.I.; Comparative performance of QuantiFERON(®)-TB Gold IT versus tuberculin skin test among contact investigations for latent tuberculosis infection. *Medicina Clínica (Barcelona)*. 2011 Sep 17;137(7):289-96. Epub 2011 Apr 27.

D'Oliveira Júnior, A.; Costa, S.R.M.; Barbosa, A.B.; Orge, M.L.G.O.; Carvalho, E.M.; Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 92(1): 15-20, Jan./Feb. 1997.

Detjen, A.K.; Loebenberg, L.; Grewal, H.M.S.; Stanley, K.; Gutschmidt, A.; Kruger, C.; Du Plessis, N.; Kidd, M.; Beyers, N.; Walzl, G.; Hesselning, A.C.; Short-Term Reproducibility of a Commercial Interferon Gamma Release Assay. *Clinical and Vaccine Immunology*, Aug. 2009; Vol. 16, No. 8p., 1170–1175.

Faria, D.R.; Gollob, K.J.; Barbosa, J. Jr.; Schriefer, A.; Machado, P. R. L.; Lessa, H.; Carvalho, L.P.; Romano-Silva, M.A.; Jesus, A.R.; Carvalho, E.M.; Dutra, W.O.; Decreased in situ expression of Interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and Immunity*, Dec. 2005, p. 7853–7859.

Follador, I., C. Araujo, M. A. Cardoso, J. Tavares-Neto, A. Barral, J. C. Miranda, A. Bittencourt, and E. M. Carvalho. 1999. [Outbreak of American cutaneous leishmaniasis in Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brazil]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 32:497-503.

_____; C. Araujo, O. Bacellar, C. B. Araujo, L. P. Carvalho, R. P. Almeida, and E. M. Carvalho. 2002. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clinical Infectious Diseases*. 34:E54-58.

(FUNASA) Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde; Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana; Brasília – 2000; 62 p. il.

Giudice, A.; Vendrame, C.; Bezerra, C.; Carvalho, L.P.; Delavechia, T.; Carvalho, E.M.; Bacellar, O.; Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infection Diseases*. 2012 “in press”.

Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R.; Leishmaniose tegumentar americana; *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(1):71-80, jan-fev, 2003.

Gonzalez, A; Biagi, F.; Verification of asymptomatic infections in Mexican cutaneous leishmaniasis. *La Prensa Médica Mexicana*. 1968 Nov-Dec;33(11):421-2.

Gomes-Silva, A.; Bittar, R.C.; Nogueira, R.S.; Amato, V.S.; Mattos, M.S.; Oliveira-Neto, M.P.; Coutinho, S.G.; Da-Cruz, A.M. Can IFN- γ and IL-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clinical and Experimental Immunology*. 2007, 149: 440–444.

Grimaldi, G.; Tesh, R.B.; McMahon-Pratt, D.; A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1989, 41: 687–725.

Guerra, M.O.P.; Furtado, T.; Barros, G.C.; Sessa, P.A.; Carias, V.R.D.; Infecção subclínica na leishmaniose tegumentar americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 60 (6): 365-369, 1985.

Guimarães, L.H.; Machado, P.R.L.; Lago, E.L.; Morgan, D.J. ; Schriefer, A.; Bacellar, O.; Carvalho, E.M.; Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (2009) 103, 712—715.

Hailu, A.; Poll, T.V.D.; Berhe, N.; Kager, P.A.; Elevated plasma levels of Interferon (IFN)- γ , IFN- γ inducing cytokines, and IFN- γ inducible CXC Chemokines in Visceral Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004, 71(5), pp. 561–567.

Jones, T. C.; Johnson, W. D.Jr.; Barretto, A. C.; Lago, E.; Badaro, R. ; Cerf, B.; Reed, S. G.; Netto, E. M.; Tada, M. S.; Franca, T. F.; 1987. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Journal Infectious Diseases* 156:73-83.

Kedzierski, L.; Zhu, Y.; Handman, E.; Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitology* (2006), 133, S87–S112.

Lainson, R.; The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology.; *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1983;77(5):569-96.

Lessa, H.A.; Machado, P.; Lima, F.; Cruz, A.A.; Bacellar, O.; Guerreiro J.; Carvalho, E.M.; Successful Treatment Of Refractory Mucosal Leishmaniasis With Pentoxifylline Plus Antimony. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001, 65(2), pp. 87–89.

Liew, F.Y.; Li, Y.; Severn, A.; Millott, S.; Schmidt, J.; Salter, M.; Moncada, S.; A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *European Journal of Immunology*. 1991; Oct; 21(10):2489-94.

Llanos Cuentas, E.; A. Cuba, C. C.; Barreto, A. C.; Marsden, P. D.; Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis* infections; *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1984. 78:845-846.

Maasho, K.; Sanchez, F.; Schurr, E.; Hailu, A.; Akuffo, H.; Indications of the Protective role of Natural Killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infection and Immunity*, June 1998, p. 2698–2704.

Machado, P.R.L.; Lessa, H.; Lessa, M.; Guimarães, L.H.; Bang, H.; Ho, J.L.; Carvalho, E.M.; Oral Pentoxifylline Combined with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Mucosal Leishmaniasis.; *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:788–93.

_____ ; Rosa, M.E.; Costa, D.; Mignac, M.; Silva, J.S.; Schriefer, A.; Teixeira, M.M.; Bacellar, O.; Carvalho, E.M. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011 Aug;105(8):438-44. Epub 2011 Jul 2.

Machado Junior, A. S. ; Emodi, K. ; Takenami, I. ; Finkmoore, B.; Barbosa, T ; Carvalho, J. S. ; Cavalcanti, L. ; Santos, G. S. ; Tavares, M. H. M. ; Mota, M. L. ; Barreto, F. A. ; Reis, M. G. ; Arruda, S ; Riley, L. W.; Analysis of discordance between the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2009, v. 13, p. 446-453,

Mahomed, H., Hughes, E.J.; Hawkrigde, T.; Minnies, D.; Simon, E.; Little, F.; Hanekom, W.A.; Geiter, L.; Hussey, G.D.; Comparison of Mantoux skin test with three generations of a whole blood IFN- γ assay for tuberculosis infection. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2006; 10(3):310–316.

Mascarenhas, R.E.; Brodskyn, C.; Barbosa, G.; Clarêncio, J.; Andrade-Filho, A.S.; Figueiroa, F.; Galvão-Castro, B.; Grassi, F.; Peripheral Blood Mononuclear Cells from individuals infected with Human T-Cell Lymphotropic virus type 1 have a reduced capacity to respond to recall antigens. *Clinical and Vaccine Immunology*, May 2006, p. 547–552.

Miranda, J.C.; Reis, E.; Schriefer, A.; Gonçalves, M.; Reis, M.G.; Carvalho, L.; Fernandes, O.; Barral-Netto, M.; Barral, A.; Frequency of Infection of Lutzomyia Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and Polymerase Chain Reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, March 2002, Rio de Janeiro, Vol. 97(2): 185-188.

Murray, H.W.; Rubin, B.Y.; Rothermel, C.D.; Killing of Intracellular *Leishmania donovani* by Lymphokine-stimulated Human Mononuclear Phagocytes. *The Journal of Clinical Investigation*. October 1983. Vol.72; 1506-1510.

Novoa, R.; Bacellar, O.; Nascimento, M.; Cardoso, T.M.; Ramasawmy, R.; Oliveira, W.N.; Schriefer, A.; Carvalho, E.M.; IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L.braziliensis* Infection. *Parasite Immunology*. 2011 February ; 33(2): 132–136.

(OPAS) Organizacion Panamericana de la Salud. Las leishmaniasis en las Americas. *Boletin Epidemiológico*. Washington, Septiembre 1994, Vol 15, nº3. 8-13.

Oztürk N, Sürücüoğlu S, Ozkütük N, Gazi H, Akçali S, Köroğlu G, Çiçek C. Comparison of interferon-gamma whole blood assay with tuberculin skin test for the diagnosis of tuberculosis infection in tuberculosis contacts. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2007 Apr;41(2):193-202.

Penido, C.; Vieira-de-Abreu, A.; Bozza, M.T.; Faria-Neto, H.C.C.; Bozza, P.T.; Role of Monocyte Chemotactic Protein-1/CC chemokine ligand 2 on $\gamma\delta$ T Lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *Journal of Immunology*, 2003;171;6788-6794.

Reed, S.G.; Badaró, R.; Masur, H.; Carvalho, E.M.; Lorencó, R.; Lisboa, A.; Teixeira, R.; Johnson, W.D. Jr.; Jones, T.C.; Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (1986) 35(1): 79-85.

Ribeiro-de-Jesus, A.; Almeida, R.P.; Lessa, H.; Bacellar, O.; Carvalho, E.M.; Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998 Jan; 31(1):143-8.

Ritter, U.; Körner, H.; Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 2002, 24, 295–301.

Rot, A.; Andrian, U.H.; Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic chemokines grammar for immune cells. *Annual Review of Immunology*. 2004. 22:891–928.

Salinas, C.; Ballaz, A.; Diez, R.; Pablo, J.I.; Pocheville, I.; Aguirre, U.; Estudio de contactos em niños y adolescentes usando el QuantiFERON-TB® gold in-tube. *Anales de pediatria (Barcelona)*. 2011; 74(6):363-370.

Sassi, A.; Louzir, H.; Salah, A.B.; Mokni, M.; Osman, A.B.; Dellagi, K.; Leishmanin skin test, lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clinical & Experimental Immunology*. 1999, 116:127–132.

Scharton, T. M.; Scott, P.; Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *Journal of Experimental Medicine. Pennsylvania*, ago. 1993. 178(2):567-77.

Schriefer, A.; Schriefer, A.L.F.; Góes-Neto, A.; Guimarães, L.H.; Carvalho, L.P.; Almeida, R.P.; Machado, P.R.; Lessa, H.A.; Ribeiro de Jesus, A.; Riley, L.W.; Carvalho, E.M.; Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. *Infection and Immunity*, Jan. 2004, Vol. 72, No. 1; p. 508–514.

Sher, A.; Sacks, D.L.; Scott, P.A.; Host and parasite factors influencing the expression of cutaneous leishmaniasis. *Ciba Foundation symposium*. 1983;99:174-89.

Scott, P.; Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. *Cellular Microbiology* (2005) 7(12), 1707–1713.

Teixeira, C.; Gomes, R.; Barral-Netto, M.; Barral, A.; Brodskyn, C.; 2005. Influência da saliva de flebotômíneos na leishmaniose experimental e humana. *Gazeta Médica da Bahia* 2005;75:1(Jan-Jun):18-23.

Trujillo, C. M.; Robledo, S. M.; Franco, J. L.; Velez, I. D.; Erb, K.J.; Patiño, P. J.; Endemically exposed asymptomatic individuals show no increase in the specific *Leishmania (Viannia) panamensis* -Th1 immune response in comparison to patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 2002, 24, 455 – 462.

Venuprasad, K.; Chattopadhyay, S.; Saha, B.; CD28 signaling in neutrophil induces T-cell chemotactic factor(s) modulating T-cell response. *Human Immunology*. 2003 Jan;64(1):38-43.

Weigle, K.A.; Valderrama, L.; Arias, A.L.; Santrich, C.; Saravia, N.G.; Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991; 44(3):260–271.

Yoneda T. [Relation between malnutrition and cell-mediated immunity in pulmonary tuberculosis]. *Kekkaku*. 1989 Oct;64(10):633-40.

ANEXOS

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

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

4. N° do LTCP 3. N° do ILCF *

5. N° da Família

6. N° do indivíduo na Família *

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

Dados Demográficos

14. Sexo:..... masculino feminino

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

16. Naturalidade: _____ 17. Ocupação:

Trabalhador rural Dona de casa Estudante Comerciante Motorista Outra

18. Cidade/Vilarejo* _____

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

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

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

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

História Médica Progressa

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

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

193. Já esteve no PSCP?..... não sim

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

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

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

197. Ano de início da lesão cutânea: _____

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

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

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

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

201. Ano de diagnóstico da lesão mucosa: _____

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

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

Exposição Ambiental

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

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

4. N° do LTCP 1 1 1 1 1 1 3. N° do TMRC 1 1 1 1 1 1* 5. N° da Família 1 1 1 1

Exposição Ambiental (Continuação)

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

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

179. Há eletricidade em casa?0 não 1 sim
 180. Há sanitário em casa?.....0 não 1 sim
 181. Usa mosquiteiro para dormir?.....0 não 1 sim
 182. Há resto de mata próximo a casa (raio de 100 m).....0 não 1 sim
 183. Há roça próxima a casa (raio de 50 metros)?.....0 não 1 sim
 184. Há galinheiro próximo a casa (raio de 50 metros)?.....0 não 1 sim
 185. Há pocilga próxima a casa (raio de 50 metros)?0 não 1 sim
 186. Há curral próximo a casa (raio de 50 metros)?0 não 1 sim
 187. Ocupação entre 16:00 e 24:00 hs:.....0 Permanece em casa 1 Sai de casa
 188. Se “Sai de casa”, sai para:
 0 Caçar/pescar.....1 Estudo/trabalho.....2 Outro
 189. Se “Sai de casa para outro”, especifique: _____

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

52. N° total de lesões de pele:.....1 1 1 1
 53. Tempo de duração da lesão ativa (semanas):.....1 1 1 1
Número e tipos de lesões:
 54. Ulceradas.....1 1 1 1
 55. Pápulas1 1 1 1
 56. Nódulos1 1 1 1
 57. Vegetações1 1 1 1
 58. Verucosas.....1 1 1 1

Lesão principal:

59. Local maior lesão (marque apenas UM):

- 0 Cabeça 1 Face 2 Pescoço 3 Tronco 4 Braço D 5 Braço E
 6 Antebraço D 7 Antebraço E 8 Coxa D 9 Coxa E 10 Perna D 11 Perna E 12 Outro

60. Se “Outro”, especificar: _____

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

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

Nome do Paciente: _____

Nº do Projeto: _____

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

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

Convite e Objetivo:

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

Participação voluntária:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Assinatura ou impressão digital do participante Data Hora

Nome/Assinatura do pesquisador Data Hora

Nome/Assinatura da testemunha Data Hora

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

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

Nome do paciente: _____

Número de identificação no Projeto:

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

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

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

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

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

_____ Data _____ hora _____
Assinatura ou impressão digital do paciente

_____ Data _____ hora _____
Assinatura ou impressão digital do responsável

_____ Data _____ hora _____
Testemunha

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

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

_____ Data _____ hora _____
Investigador

ANEXO 3. Ofício do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUPES, aprovando a investigação



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

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

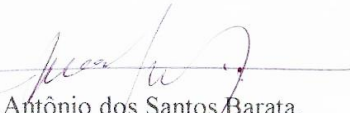
PARECER/RESOLUÇÃO ADITIVA N.º 240/2009

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

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

APROVADO

Salvador, 30 de Outubro de 2009


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

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