

Wilfredo Humberto Sosa Ochoa

Caracterização do espectro clínico-imunológico da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em Honduras, América Central.

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti

São Paulo

2021

Wilfredo Humberto Sosa Ochoa

Caracterização do espectro clínico-imunológico da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em Honduras, América Central.

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sosa Ochoa, Wilfredo Humberto
Caracterização do espectro clínico-imunológico da
infecção humana por Leishmania (Leishmania) infantum
chagasi em Honduras, América Central / Wilfredo
Humberto Sosa Ochoa. -- São Paulo, 2021.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Márcia Dalastra Laurenti.

Descritores: 1.Leishmaniose 2.Doenças
negligenciadas 3.Leishmania infantum 4.Imunidade
humoral 5.Imunidade celular 6.Epidemiologia 7.
Honduras

USP/FM/DBD-428/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho às três pessoas mais importantes em minha vida: meu filho Felipe, minha esposa Gabriela e minha mãe Elvia, obrigado por todo o apoio e a espera paciente de meu retorno à casa.

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer a Dra. Marcia Dalastra Laurenti, pela oportunidade, pela confiança e por acreditar no meu trabalho. Meu maior respeito e admiração por você como pesquisadora, orientadora e ser humano.

Ao Dr. Fernando Tobias Silveira, pelas árduas jornadas em Amapala, todo esse conhecimento adquirido marcou esta fase de pesquisador em minha vida.

À Dra. Vania Lucia da Matta, por todo o suporte dado, tanto para a realização do meu trabalho como para meu desenvolvimento profissional.

A Thaíse Tomokane, pela árdua análise estatística dos resultados obtidos neste estudo, que foram fundamentais para a apresentação desta tese de doutorado. Muito obrigado por tudo.

Ao Fredy Galvis, pela amizade e pela confiança. Muito obrigado.

A todos os amigos e colegas do LIM-50: Edson, Lia, Jéssica, Juliana, Carmen, Gabriela, Gaby Rodrigues.

Aos amigos Kadir Gonzalez, Ricardo Galicia, Alesandra Luna, Kelly Tafur, Leo, Gilvo, por contribuir para que a minha estadia no Brasil fosse mais confortável.

À Jessica Cardenas, pelo apoio dado na seleção da população do estudo e na coleta de material biológico em Amapala, foram três anos de muito trabalho, cansativo e você sempre esteve a disposição para me ajudar com o trabalho. Muito obrigado por todo o apoio e amizade.

Ao pessoal do Centro de Saúde de Amapala: Lic. Edith, Elias, Ronald, Cecilia, Andres, Kilvert. Muito obrigado pelo apoio.

Ao Dr. Carranza (*in memorium*), obrigado por acreditar em nosso trabalho.

Ao Dr. Concepción Zuñiga, obrigado pelo apoio junto ao Ministério de Saúde para o apoio à realização deste trabalho.

Às minhas amigas: Carol, Wendy, Fanny e Maria Mercedes, obrigado pela amizade, o apoio e as palavras de ânimo nos momentos de ansiedade.

Aos meus amigos do Departamento de Parasitología da Universidad Nacional Autónoma de Honduras, por todo o apoio durante esses 4 anos de estudo.

Ao meus pais Rosita, e Will (*in memorium*) pelo apoio incondicional. Aos meus irmãos Walter, Jorge e Cristian pelo aconchego. Ao meu sogro, por todo o apoio e confiança.

Aos Laboratórios de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-50) e ao Centro de Investigaciones Genéticas (CIG) da Universidad Nacional Autónoma de Honduras pelo suporte dado à execução do trabalho.

A minha Universidad Nacional Autónoma de Honduras, por acreditar em meu trabalho e sobretudo por acreditar em mim.

Às agências de fomento à pesquisa, CAPES e FAFESP, pela bolsa cedida e recursos disponibilizados a execução do trabalho.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Leishmaniose.....	2
1.2 Agente etiológico.....	3
1.3 Ciclo de vida do parasita.....	5
1.4 Vetores.....	7
1.4.1 Morfologia das espécies de <i>Lutzomyia</i>	8
1.4.2 Espécies de <i>Lutzomyia</i> de importância em Honduras.....	8
1.5 Leishmaniose Cutânea não Ulcerada ou Atípica na América Central.....	10
1.6 Distribuição das Leishmanioses em Honduras.....	10
1.6.1 Leishmaniose Visceral (LV).....	11
1.6.2 Leishmaniose Cutânea Não Ulcerada (LCNU).....	11
1.6.3 Leishmaniose Cutânea Ulcerada (LCU).....	12
1.6.4 Espécies de <i>Leishmania</i> descritas em Honduras.....	13
1.6.5 Epidemiologia da leishmaniose cutânea não ulcerada em Honduras.....	14
1.7 Patogenia e Imunidade da Leishmaniose Visceral.....	17
1.7.1 Imunopatologia da Leishmaniose Cutânea Não Ulcerada.....	19
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Tipo de Estudo.....	28
4.2 Área do estudo.....	28
4.3 População estudada.....	31
4.4 Tipo de amostragem.....	31
4.5 Avaliação clínica.....	32

4.6 Coleta de amostras	33
4.7 Desenho do estudo	33
4.8 Procedimentos dos testes imunológicos	34
4.8.1 Reação Intradérmica de Montenegro ou Teste de Hipersensibilidade Tardia (DTH)	34
4.8.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	35
4.9 Critérios de identificação da infecção humana.....	37
4.10 Avaliação clínica e laboratorial dos indivíduos infectados.....	37
4.11 Diagnóstico molecular e caracterização de espécies de parasitas de <i>Leishmania</i>	38
4.12 Resposta imune humoral e celular	39
4.13 Análise estatística	40
4.14 Considerações éticas.....	40
5. RESULTADOS	42
5.1 Aspectos clínicos e demográficos da população estudada.....	43
5.2 Diagnóstico parasitológico e molecular dos indivíduos acometidos por leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU).....	45
5.3 Características clínicas das lesões cutâneas da LCNU	47
5.4 Prevalência de infecção humana por <i>L. (L.) infantum chagasi</i> no município de Amapala, Honduras	49
5.5 Determinação do perfil de citocinas no espectro clínico-imunológico da infecção humana por <i>L. (L.) infantum chagasi</i> em Amapala, Honduras.....	54
5.6 Determinação de subclasses de imunoglobulinas, IgG1 e IgG2.....	59
5.7 Distribuição de perfis clínico-imunológicos da infecção humana por <i>L. (L.) infantum chagasi</i> no estudo de incidência	62
5.8 Distribuição por idade dos perfis clínico-imunológicos da infecção humana por <i>L. (L.) infantum chagasi</i> nos estudos de prevalência e incidência.	63
5.9 Dinâmica da evolução clínica e imunológica da infecção humana por <i>L. (L.) infantum chagasi</i> no município de Amapala, Valle, Honduras	65
6. DISCUSSÃO.....	68
7. CONCLUSÕES.....	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
9. APÊNDICES	

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama
%	por cento
°C	graus Celsius
gl	graus de liberdade
mL	mililitros
mm	milímetro
n	Número de elementos (refere-se à amostra)
N	normalidade (química)
nm	nanômetros
pb	par de bases
μg	micrograma
μL	microlitros
μmol	micromolar
V	voltagem

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APCs	Células apresentadoras de antígenos
CEI-MEIZ	Comitê de Ética do Programa de Mestrado em Doenças Infecciosas e Zoonóticas da Escola de Microbiologia da Universidade Nacional Autônoma de Honduras
DTH	Teste de Hipersensibilidade Tardia
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FoxP3+	Fator de transcrição forkhead box P3
Hsp70	<i>Heat shock protein 70</i> (proteína de choque térmico de 70 quilodaltons)
IAI	Infecção Assintomática Indeterminada
IAR	Infecção Assintomática Resistente
IAF	Infecção Assintomática Final
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina tipo E
IgG1	Imunoglobulina tipo G subclasse 1
IgG2	Imunoglobulina tipo G subclasse 2
IL	Interleucina
IgM	Imunoglobulina tipo M
ISI	Infecção Sintomática Indeterminada
ISF	Infecção Sintomática Final
ISP	Infecção Sintomática Precoce
ISR	Infecção Sintomática Resistente
L.	<i>Leishmania</i>

LC	Leishmaniose cutânea
LCA	Leishmaniose Cutânea Atípica
LCNU	Leishmaniose Cutânea Ulcerada
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
LV	Leishmaniose visceral
NO	Óxido nítrico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
Th	T Auxiliar (do inglês: T helper)
TGF	Fator de transformação do crescimento
TMB	3,30', 5,50' tetrametilbenzidina
Tween-20	Polissorbato 20
<i>V.</i>	<i>Viannia</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Chave taxonômica de parasitas do gênero *Leishmania*. Adaptada de (AKHOUNDI *et al.*, 2016; KLATT *et al.*, 2019).5
- Figura 2:** Ciclo de vida de parasita do gênero *Leishmania* em hospedeiro vertebrado e invertebrado (ESCH; PETERSEN, 2013). Os flebotomíneos inoculam promastigotas infectivas em um mamífero vertebrado durante a sua alimentação sanguínea. As promastigotas são fagocitadas por fagócitos residentes, transformam-se em amastigotas e se multiplicam dentro dessas células por meio da divisão binária simples. O parasita continua infectando células fagocíticas, quer no local da infecção cutânea, quer nos órgãos linfóides secundários, com eventual parasitemia. Os flebótomos são infectados pela alimentação sanguínea em um hospedeiro vertebrado com lesão cutânea ou sistêmica, no caso da leishmaniose visceral. Os parasitas se transformam em promastigotas dentro do intestino médio dos flebótomos. Promastigotas migram do intestino médio e se transformam em promastigotas metacíclicas altamente infecciosas (Fonte: CDC, Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>).7
- Figura 3:** Leishmaniose cutânea atípica. A. Placa cor pele, elevada, cercada de halo hipopigmentado. B. Placa pós-tratamento. Observe-se o aplanamento e a atrofia da lesão (CASTRO *et al.*, 2008) 12
- Figura 4:** Distribuição geográfica da leishmaniose Tegumentar e Visceral em Honduras..... 13
- Figura 5:** Diferentes apresentações clínicas de leishmaniose cutânea atípica em Honduras. A: Lesão nodular, elevada, eritematosa de superfície lisa. B: Múltiplas lesões em forma de pápulas na fronte (seta amarela) e placas na região mandibular (seta azul) (CASTRO *et al.*, 2008) 16
- Figura 6:** Mapa de localização do município de Amapala (mapa elaborado por Cesar Rios)29
- Figura 7:** Zona de vida identificada em relação ao Sistema Holdrige. (a) meses secos; (b) meses chuvosos.....30

Figura 8: (a) Tipo comum de moradia rural; (b) cães ao redor da moradia.	30
Figura 9: Fotomicrografia de esfregaço de raspado de lesão de pele de paciente com suspeita de leishmaniose cutânea não ulcerada. Formas amastigotas do parasita podem ser observadas, com destaque no círculo (Giemsa, objetiva 100x).....	46
Figura 10: Fotografia de gel de agarose para amostras isoladas de pacientes LCNU. A: PCR gênero-específico revelando um fragmento de 120 pb do kDNA de <i>Leishmania</i> . B: PCR-RFLP após digestão com <i>Hae</i> III de um fragmento de Hsp70 de 234 pb. Colunas 1-3: amostras isoladas de lesão cutânea de pacientes com LCNU; Coluna 4: <i>Leishmania (L.) infantum</i> (MHOM/BR/1972/BH46); Coluna 5: <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> (MHOM/BR/1973/M2269), Coluna 6: <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> (MHOM/BR/1995/M15280); NC: controle negativo; MW: padrão de peso molecular.	47
Figura 11: Frequência de positividade para o teste de hipersensibilidade tardia (DTH) ou teste de Montenegro (A) e para a reação de ELISA (B) em indivíduos sintomáticos (LCNU) e assintomáticos arrolados neste estudo. Município de Amapala, Honduras, 2017.....	51
Figura 12: Distribuição de frequência dos perfis clínico-imunológico da infecção humana assintomática por <i>L. (L.) infantum chagasi</i> , no município de Amapala, Valle, Honduras. IAI: Infecção Assintomática Indeterminada; IAR: Infecção Assintomática Resistente; IAF: Infecção Assintomática Final.	52
Figura 13: Distribuição da frequência dos perfis clínico-imunológico da infecção humana por <i>L. (L.) infantum chagasi</i> nos indivíduos acometidos por leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU), no município de Amapala, Valle, Honduras. ISI: Infecção Sintomática Indeterminada; ISR: Infecção Sintomática Resistente; ISF: Infecção Sintomática Final; ISP: Infecção Sintomática Precoce.....	54
Figura 14: Gráficos em box plot mostrando a média, mediana, valores máximos e mínimos, e intervalos de confiança das concentrações séricas de IL-2 (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D), IL17A (E), IL-4 (F) e IL10 (G) no perfil clínico-imunológico da infecção humana por <i>L. (L.) infantum</i>	

chagasi e os controles normal (CN) e infecção visceral (LV). Município de Amapala, Honduras, 2017. * $p < 0.05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$59

Figura 15: Gráficos em *box-plot* mostrando a média, mediana, valores máximos e mínimos, e intervalos de confiança das densidades óticas de IgG1 (A) e IgG2 (B) obtidas pelo teste de ELISA em soros de indivíduos pertencentes aos diferentes perfis clínico-imunológico da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi*. Município de Amapala, Honduras, 2017. ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$61

Figura 16: Proposta de dinâmica da evolução clínica e imunológica dos pacientes assintomáticos da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* em Honduras, América Central. IAI: infecção assintomática indeterminada; IAR: infecção assintomática resistente; IAF: infecção assintomática final66

Figura 17: Proposta de dinâmica da evolução clínica e imunológica dos pacientes sintomáticos da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* em Honduras, América Central. ESI: infecção sintomática inicial; ISI: infecção sintomática indeterminada; RSI: infecção sintomática resistente; FSI: infecção sintomática final67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição por faixa etária dos indivíduos sintomáticos, acometidos por leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU), e assintomáticos, incluídos neste estudo. Município de Amapala, Honduras, 2017.....	43
Tabela 2. Distribuição por sexo dos indivíduos sintomáticos, acometidos por leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU), e assintomáticos, incluídos neste estudo. Município de Amapala, Honduras, 2017.....	44
Tabela 3. Distribuição geográfica, por localidades, dos indivíduos sintomáticos, acometidos por leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU), e assintomáticos, incluídos neste estudo. Município de Amapala, Honduras, 2017.....	45
Tabela 4. Características clínicas das lesões de pele dos pacientes acometidos pela leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU). Município de Amapala, Honduras, 2017.....	48
Tabela 5. Reatividade ao teste de hipersensibilidade tardia (DTH) para antígeno específico e teste de ELISA para IgG e IgM em indivíduos residentes em área endêmica de transmissão de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> , município de Amapala, Honduras, 2017.....	50
Tabela 6. Distribuição dos perfis clínico-imunológicos da infecção humana por <i>L. (L.) infantum chagasi</i> na prevalência e incidências em indivíduos assintomáticos.	62
Tabela 7. Distribuição dos perfis clínico-imunológicos da infecção humana por <i>L. (L.) infantum chagasi</i> na prevalência e incidência em pacientes sintomáticos.	63
Tabela 8. Distribuição por idade dos perfis clínico-imunológico da infecção humana por <i>L. (L.) infantum chagasi</i> em indivíduos assintomáticos nos estudos de prevalência e incidência no município de Amapala, Valle, Honduras.....	64
Tabela 9. Distribuição por idade dos perfis clínico -imunológico da infecção humana por <i>L. (L.) infantum chagasi</i> em pacientes sintomáticos nos estudos de prevalência e incidência no município de Amapala, Valle, Honduras.....	64

RESUMO

Sosa-Ochoa W. *Caracterização do espectro clínico-imunológico da infecção humana por Leishmania (Leishmania) infantum chagasi em Honduras, América Central* [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

As leishmanioses se caracterizam por amplo espectro clínico e imunológico de manifestações dependendo da espécie de *Leishmania*, da resposta imune do hospedeiro e, possivelmente, de fatores presentes na saliva do inseto vetor. Na América Central, especificamente em Honduras, a infecção por *L. (L.) infantum chagasi* mostra manifestações atípicas no homem, causando a leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU) em adolescentes e adultos jovens, e leishmaniose visceral (LV) em crianças menores de cinco anos. A falta de relatos sobre a patogenia e o aumento no número de casos, em especial da LCNU, na região nos motivou a avaliar a dinâmica da evolução clínica-imunológica da infecção por *L. (L.) infantum chagasi* em Honduras. Uma coorte de 576 indivíduos foi acompanhada por um período de dois anos por meio de exames clínico-laboratoriais. Após exame clínico, os indivíduos foram submetidos ao teste intradérmico de Montenegro (DTH) e sangue total foi coletado para determinação de IgG e IgM nos soros por ELISA. Os casos clínicos de LCNU foram confirmados pelo exame parasitológico direto e a espécie do parasita foi caracterizada por PCR-RFLP. Para avaliar a imunidade humoral e celular, foi empregado ELISA para subclasses de imunoglobulinas (IgG1/IgG2) e o Kit Cytokine Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17, respectivamente. A avaliação clínica mostrou 82% indivíduos assintomáticos e 18% sintomáticos com LCNU. Todos os indivíduos acometidos por LCNU mostraram diagnóstico parasitológico positivo pelo exame direto e a PCR-RFLP identificou *L. (L.) infantum chagasi* em 100% dos casos. As lesões cutâneas mostraram-se ≤ 5 mm, em geral, únicas e acometeram principalmente adultos jovens do sexo feminino. Dos 472 indivíduos assintomáticos, 320 apresentaram ELISA+ e/ou DTH+, portanto, considerados expostos à infecção por leishmania, levando a uma prevalência final da infecção de 73,6%. Baseado na avaliação clínica, parasitológica e imunológica pudemos observar sete perfis de infecção, três assintomáticos [Infecção Inicial Indeterminada – III (ELISA+/DTH-), Infecção Assintomática Resistente – IAR (ELISA+/DTH+), Infecção Assintomática Final – IAF (ELISA-/DTH+)] e quatro sintomáticos [Infecção Sintomática Precoce – ISP (ELISA-/DTH-), Infecção Sintomática Inicial – ISI (ELISA+/DTH-), Infecção Sintomática Resistente – ISR (ELISA+/DTH+), Infecção Sintomática Final – ISF (ELISA-/DTH+)]. O perfil de ISF foi o mais frequente observado na LCNU durante a prevalência e a avaliação da dinâmica da evolução clínica-imunológica da infecção, mostrou que 59% dos pacientes no perfil ISP evoluiu para ISF, perfil caracterizado por forte resposta imune celular frente a antígeno específico. Porém, a resposta imune celular (avaliado por detecção de citocinas Th1/Th2/Th17) e humoral (avaliada pela detecção de IgM/IgG/IgG1/IgG2) sistêmica mostrou-se fraca nos soros de pacientes acometidos por LCNU. Os resultados obtidos neste estudo mostraram uma alta prevalência da infecção por *L. (L.) infantum chagasi* em Amapala, região sul de Honduras, com a presença marcante da forma cutânea atípica (LCNU) e ausência da forma visceral (LV) da doença. Através de exame clínico, parasitológico e imunológico, 3 perfis de infecção assintomática e 4 sintomática. A dinâmica da evolução da infecção sintomática mostrou a predominância do perfil ISF, apontando para um perfil de resistência da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* nos habitantes da região do Pacífico de Honduras. Estes achados, além de contribuir para o conhecimento da patogenia da infecção causada por *L. (L.) infantum chagasi* na América Central, poderão contribuir para implementação de políticas públicas na região.

Descritores: Leishmaniose; Doenças negligenciadas; *Leishmania infantum*; Imunidade humoral; Imunidade celular; Epidemiologia; Honduras.

ABSTRACT

Sosa-Ochoa W. *Characterization of the clinical-immunological spectrum of human infection by Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in Honduras, Central America* [thesis] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Leishmaniasis is characterized by a broad clinical and immunological spectrum of manifestations depending on the *Leishmania* species, the host's immune response and, possibly, factors present in the insect vector's saliva. In Central America, specifically in Honduras, infection by *L. (L.) infantum chagasi* shows atypical manifestations in humans, causing non-ulcerated cutaneous leishmaniasis (NUCL) in adolescents and young adults, and visceral leishmaniasis (VL) in children under five years old. The lack of reports on the pathogenesis and the increase in the number of cases, especially from the NUCL in the region lead us to assess the dynamics of the clinical-immunological evolution of *L. (L.) infantum chagasi* infection in Honduras. A cohort of 576 individuals was followed for a period of two years through clinical and laboratory exams. After clinical examination, the individuals were submitted to the Montenegro intradermal test (DTH) and whole blood was collected for the determination of IgG and IgM in the sera by ELISA. Clinical cases of LCNU were confirmed by direct parasitological examination and the parasite species was characterized by PCR-RFLP. To assess humoral and cellular immunity, ELISA for immunoglobulin subclasses (IgG1/IgG2) and the Cytokine Bead Array Kit (CBA) Human Th1/Th2/Th17, respectively, were used. Clinical evaluation showed 82% asymptomatic individuals and 18% symptomatic with NUCL. All individuals affected by NUCL showed a positive parasitological diagnosis by direct examination and PCR-RFLP identified *L. (L.) infantum chagasi* in 100% of the cases. Skin lesions were ≤ 5 mm, usually, single and mainly affecting young female adults. Of the 472 asymptomatic individuals, 320 showed ELISA+ and/or DTH+, therefore considered exposed to leishmania infection, leading to a final infection prevalence of 73.6%. Based on the clinical, parasitological and immunological evaluation, we could observe seven infection profiles, three asymptomatic [Indeterminate Initial Infection – III (ELISA+/DTH-), Resistant Asymptomatic Infection – RAI (ELISA+/DTH+), Final Asymptomatic Infection – FAI (ELISA-/DTH+)] and four symptomatic [Early Symptomatic Infection – ESI (ELISA-/DTH-), Initial Symptomatic Infection – ISI (ELISA+/DTH-), Resistant Symptomatic Infection – RSI (ELISA+/DTH+), Final Symptomatic Infection – FSI (ELISA-/DTH+)]. The FSI profile was the most frequent observed in the LCNU during the prevalence and the evaluation of the dynamics of the clinical-immunological evolution of the infection, showing that 59% of the patients in the ESI profile evolved to FSI, a profile characterized by strong cellular immune response against specific antigen. However, the cellular (evaluated by detection of Th1/Th2/Th17 cytokines) and humoral (evaluated by the detection of IgM/IgG/IgG1/IgG2) systemic immune responses was weak in sera from patients affected by NUCL. The results obtained in this study showed a high prevalence of *L. (L.) infantum chagasi* infection in Amapala, southern Honduras, with the marked presence of the atypical cutaneous form (NUCL) and absence of the visceral form (VL) of the disease. Through clinical, parasitological and immunological examination, 3 asymptomatic and 4 symptomatic profiles of infection were characterized and the dynamics. The evolution of the symptomatic infection showed the predominance of the FSI profile, pointing to a profile of resistance of human infection by *L. (L.) infantum chagasi* in the inhabitants of the Pacific region of Honduras. These findings, in addition to contributing to the knowledge of the pathogenesis of the infection caused by *L. (L.) infantum chagasi* in Central America, may contribute to the implementation of public policies in the region.

Descriptors: Leishmaniasis; Neglected diseases; *Leishmania infantum*; Immunity humoral; Immunity cellular; Epidemiology; Honduras.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença de transmissão vetorial, que é causada por espécies de parasitas que pertencem à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*. A distribuição geográfica ocorre, principalmente, em áreas tropicais e subtropicais e está presente em 98 países da Europa, África, Ásia e América (ALVAR *et al.*, 2012). Aproximadamente, 350 milhões de pessoas encontram-se em risco, morando em áreas endêmicas de transmissão do parasita do gênero *Leishmania*. Estima-se que 1,3 milhões de novos casos ocorrem anualmente, somando-se aos 10 a 12 milhões de casos encontrado globalmente (HOTEZ, 2012). No total, os números oficiais dos casos totalizaram mais de 58.000 de Leishmaniose Visceral (LV) e 220.000 de Leishmaniose Cutânea (LC) por ano (ALVAR *et al.*, 2012).

Da mesma maneira que outras doenças vetoriais, a sua apresentação em determinadas áreas geográficas encontra-se ligada a características ambientais e socioeconômicas definida pelas formas de vida do homem (BOTTINELLI *et al.*, 2006). Assim, os estudos ecoepidemiológicos se caracterizam pela inclusão de elementos da transmissão, fatores ecológicos associados e comportamentos humanos que afetam a transmissão. O estudo das características do vetor flebotomíneo como o seu comportamento, são também considerados fatores importantes para o risco de infecção e para a identificação de novos focos (CARRILLO *et al.*, 2010).

1.2 Agente etiológico

O gênero *Leishmania*, pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Tem sido descrita, aproximadamente, 53 espécies de *Leishmania*, sendo que 31 delas parasitam mamíferos e apenas 20 são patogênicas para o homem. Atualmente, o gênero *Leishmania* tem sido subdividido em cinco subgêneros e complexos, entre eles: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, complexo *L. enrietti* e *Paraleishmania* (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Os parasitos pertencentes ao subgênero *Leishmania* são encontrados no Novo (Américas) e o Velho Mundo (Europa, Ásia e África), porém os parasitos pertencentes ao subgênero *Viannia*, são endêmicos apenas no Novo Mundo. A multiplicação das espécies de *Leishmania* nas diferentes porções do trato digestivo dos vetores, hipo, peri e suprapilaria, auxiliaram a classificação dos diferentes subgêneros. Desta forma, os parasitos que se desenvolvem na região hipopilaria, portanto, são os mais primitivos do ponto de vista evolutivo e atualmente são representados por *Sauroleishmania* spp, cuja transmissão ainda é feita por contaminação fecal; eles são reptilianos e não são patogênicos ao homem (LAINSON *et al.*, 1987) (Figura 1). Os parasitos do gênero *Leishmania* passam por uma série de etapas em seu desenvolvimento. Quando as promastigotas se ancoram nas microvilosidades do trato digestivo do flebotomíneos, graças a um flagelo muito longo, são chamados de promastigota haptomona. Esta forma apresenta um corpo que mede cerca de 10 μm e tem o cinetoplasto muito próximo ao núcleo da célula (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1974). Ao se deslocar para as porções anteriores do trato digestivo, o corpo se torna mais alongado e o flagelo rico em lipofosfoglicano. Dez dias após ter sido ingerido pelo inseto vetor, a promastigota perde aderência mudando a configuração dos lipofosfoglicanos de superfície, o flagelo se torna muito

maior em comparação com o corpo magro e curto, o saco flagelar mostra-se grande e preenchido com vesículas exocíticas e material secretor; a promastigota para de se multiplicar e recupera sua infectividade, se situando já de forma livre na hipofaringe, pronta para ser inoculada; é chamada de promastigota metacíclica (SACKS; PERKINS, 1984). Uma vez que a promastigota tenha sido inoculada em um hospedeiro vertebrado, o cinetoplasto fica paralelo ao núcleo, a bolsa flagelar se aprofunda, o corpo se torna ovalado e o flagelo começa a reduzir seu tamanho; esta forma é chamada paramastigota (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1974). Antes das primeiras 24 horas após a entrada no macrófago, a amastigota completa sua forma típica no macrófago. As amastigotas são arredondadas, com cerca de 2 a 4 mm de diâmetro; elas contêm núcleo e cinetoplasto que se coram em violeta pelo Giemsa, embora, a segunda, mais intensamente. Por vezes, entre o cinetoplasto e a parede celular, se observa um rudimento de flagelo chamado rizoplasto. A forma amastigota é de apresentação intracelular, alojada no vacúolo parasitóforo do macrófago, um vacúolo que varia em tamanho, dependendo da espécie do parasita.

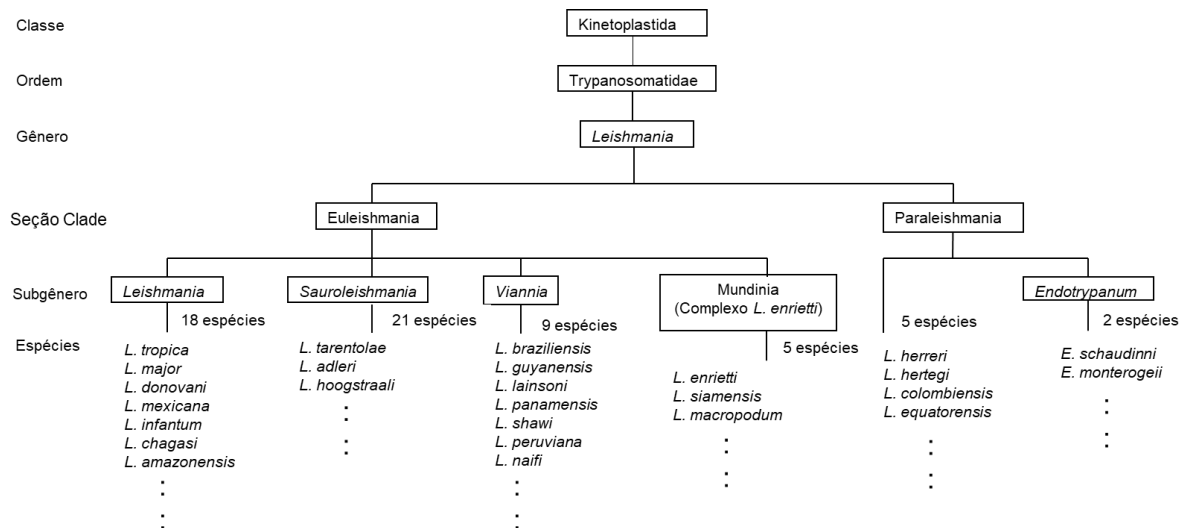


Figura 1: Chave taxonômica de parasitas do gênero *Leishmania*. Adaptada de (AKHOUNDI *et al.*, 2016; KLATT *et al.*, 2019).

1.3 Ciclo de vida do parasita

Os parasitas do gênero *Leishmania* foram descritos pela primeira vez, em 1903, por Leishman (LEISHMAN, 1904) e Donovan (DONOVAN, 1903), a partir de biópsias viscerais e cutâneas de pacientes com febre indiana.

São parasitas digenéticos por realizarem parte de seu ciclo biológico no trato digestivo de um hospedeiro invertebrado na forma flagelada e no hospedeiro vertebrado dentro das células do sistema reticulo endotelial, especialmente os macrófagos, na forma aflagelada ou amastigota. A divisão binária, forma assexuada de multiplicação clonal, tem sido descrita como o principal mecanismo de reprodução dos parasitas do gênero *Leishmania* (TIBAYRENC; AYALA, 2002; TIBAYRENC *et al.*, 1990). No entanto, a recombinação sexual, baseada em marcadores híbridos detectados em isolados de campo em localizações específicas, tem sido estudada mais profundamente nos últimos anos (KELLY *et al.*, 1991; RAVEL *et al.*, 2006; ROGERS *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2017).

Quando uma fêmea do flebotomíneo do gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) parasitada ingurgita sangue de um vertebrado, inocula saliva com promastigotas presentes na sua probóscida. Uma vez que o parasita chega aos capilares da pele no hospedeiro vertebrado, ocorre a fagocitose pelo macrófago, formando um vacúolo parasitóforo para tentar eliminar o parasita numa cascata de produção de metabólitos derivados de oxigênio e nitrito, além de liberação de hidrolases lisossomais; todas essas moléculas são depositadas no espaço intravacuolar. Mas os parasitas de *Leishmania* conseguem evadir desses mecanismos inespecíficos do macrófago, sobreviver, se diferenciar em amastigotas e se multiplicar dentro dele. Se os parasitas conseguirem sobreviver, os macrófagos parasitados podem ser ingurgitados por outro flebótomo fêmea, e no seu intestino, as amastigotas se diferenciam em formas promastigotas e, após alguns dias, chegam a alcançar a capacidade infectiva (metacliclogênese), já na proximidade da probóscida, sendo assim inoculada em outro hospedeiro vertebrado fechando o ciclo biológico (MOODY, 1993) (Figura 2).

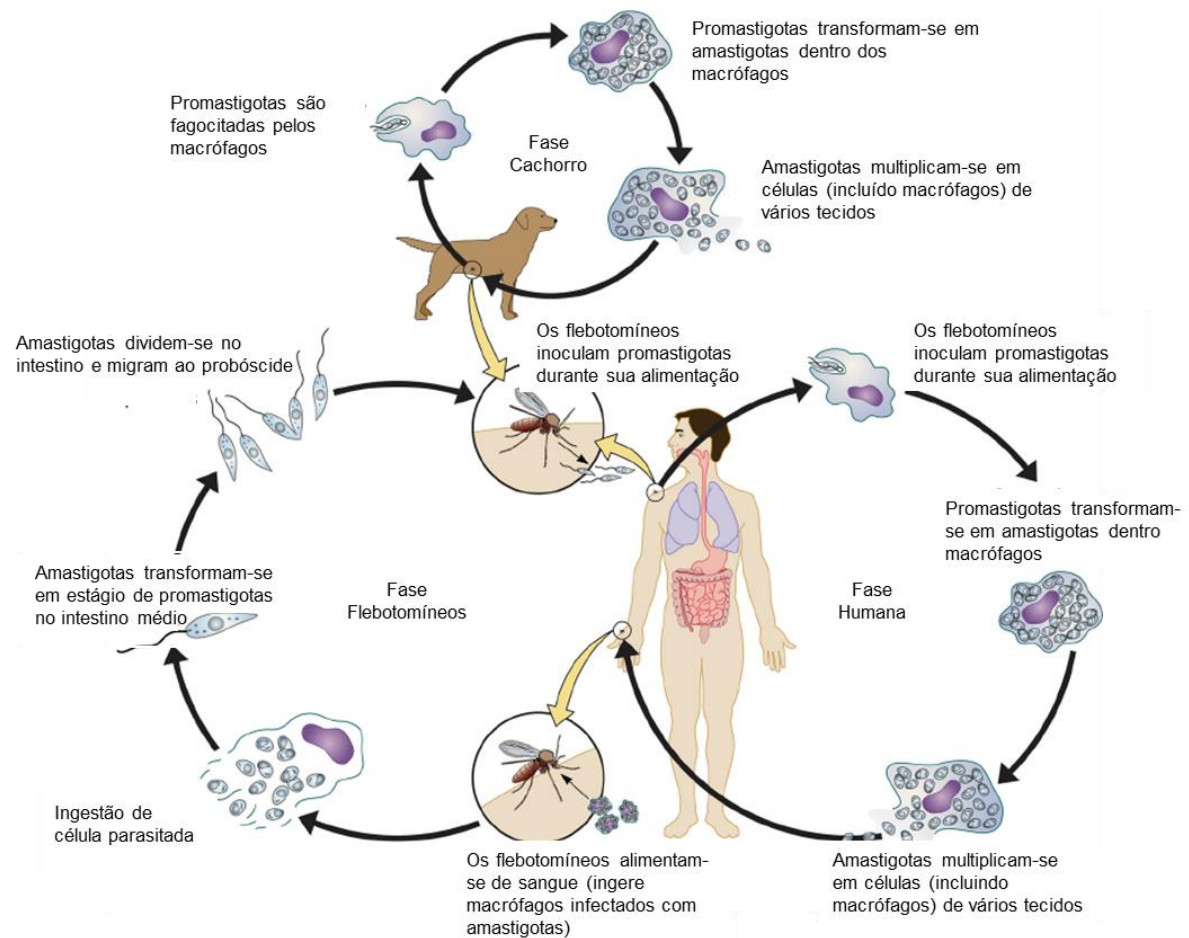


Figura 2: Ciclo de vida de parasita do gênero *Leishmania* em hospedeiro vertebrado e invertebrado (ESCH; PETERSEN, 2013). Os flebotomíneos inoculam promastigotas infectivas em um mamífero vertebrado durante a sua alimentação sanguínea. As promastigotas são fagocitadas por fagócitos residentes, transformam-se em amastigotas e se multiplicam dentro dessas células por meio da divisão binária simples. O parasita continua infectando células fagocíticas, quer no local da infecção cutânea, quer nos órgãos linfóides secundários, com eventual parasitemia. Os flebotomos são infectados pela alimentação sanguínea em um hospedeiro vertebrado com lesão cutânea ou sistêmica, no caso da leishmaniose visceral. Os parasitas se transformam em promastigotas dentro do intestino médio dos flebotomos. Promastigotas migram do intestino médio e se transformam em promastigotas metacíclicas altamente infecciosas (Fonte: CDC, Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>).

1.4 Vetores

Os vetores responsáveis pela transmissão dos parasitas do gênero *Leishmania* são dípteros hematófagos pertencentes à subfamília Phlebotominae (família Psychodidae), dentro dos quais apenas o gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus* são considerados vetores de leishmaniose, sendo o primeiro presente no continente

Americano e o segundo, no Velho Mundo (BOTERO; RESTREPO, 1998; SÁNCHEZ *et al.*, 2004; VÉLEZ *et al.*, 2010; WHO, 2010; YOUNG; DUNCAN, 1994).

1.4.1 Morfologia das espécies de *Lutzomyia*

Os espécimes adultos do gênero *Lutzomyia* são pequenos insetos de 2 a 5 mm de comprimento. Eles têm um par de asas ovais em forma de V, três pares de pernas muito longas e praticamente todo o corpo é coberto de pelos finos. Os genitais nos últimos três segmentos do abdômen permitem diferenciar fêmeas e machos, constituindo uma das principais chaves taxonômicas para identificação da espécie (SÁNCHEZ *et al.*, 2004; VÉLEZ *et al.*, 2010; YOUNG; DUNCAN, 1994).

1.4.2 Espécies de *Lutzomyia* de importância em Honduras

Atualmente, em Honduras, há relatos de 34 espécies de *Lutzomyia* (YOUNG; DUNCAN, 1994). *Lutzomyia longipalpis* é a espécie mais bem descrita no país, a partir da qual, têm sido isoladas cepas de *L. (L.) infantum*, associando este flebotomíneo como o principal vetor da leishmaniose visceral e da leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica presente na região sul de Honduras (NOYES *et al.*, 1997; PONCE *et al.*, 1991).

Em Honduras, este vetor é chamado “aludo, plaguilla, plumilla e jején”. Trinta e quatro espécies de *Lutzomyia* têm sido relatadas no país, entre elas, as de maior

importância epidemiológica são: *Lu. longipalpis*, *Lu. shannoni*, *Lu. cruciata*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. trapidoi* e *Lu. evansi* (MEJIA *et al.*, 2018; SOSA-OCHOA *et al.*, 2020a).

Sosa-Ochoa e colaboradores (2014) realizaram um levantamento entomológico entre 2012 e 2014 com o objetivo de atualizar o banco de dados das espécies encontradas em áreas endêmicas de leishmaniose atípica. Através do uso dos critérios de Young & Duncan (1994), foram identificados 5.951 indivíduos do gênero *Lutzomyia*, dos quais 3.543 (60%) eram machos e 2.404 (40%) eram fêmeas com ou sem ingestão de sangue. Desta população de insetos capturados, foram identificadas dez espécies de *Lutzomyia*: *Lu. cruciata*, *Lu. chiapanensis*, *Lu. gomezi*, *Lutzomyia sp*, subgênero *Franca*, *Lu. zeledoni*, *Lu. sanguinaria*, *Lu. trapidoi*, *Lu. longipalpis*, *Lu. evansi*, *Lu. cayenensis cayenensis*; sendo *Lu. longipalpis*, *Lu. evansi* e *Lu. cruciata* as de maior abundância.

Mejía e colaboradores em 2012 descreveram a ecoepidemiologia das espécies de *Lutzomyia* na Ilha del Tigre, Município de Amapala. Neste estudo, 13.000 espécimes do gênero *Lutzomyia* foram coletados e identificados por meio de estruturas morfológicas, de acordo com os critérios de Young & Duncan (1994), sendo observada uma predominância de 8 espécies: *Lu. evansi*, *Lu. longipalpis*, *Lu. gomezi*, *Lu. cruciata*, *Lu. chiapanensis*, *Lu. sanguinaria*, *Lu. zeledoni*, *Lu. cayennensis cayennensis*, *Lu. trapidoi* e *Lu. panamensis*. *Lutzomyia evansi* e *Lu. longipalpis* foram as mais abundantes. A abundância relativa encontrada entre *Lu. evansi* e *Lu. longipalpis* propõe novas hipóteses na transmissão da doença na Ilha del Tigre que serão descritas mais à frente.

Usando ferramentas moleculares, foi possível identificar as principais fontes de alimento das espécies capturadas no intradomicílio e peridomicílio. Em *Lu. longipalpis*, foram encontrados fragmentos de DNA de sangue de *Homo sapiens*, *Canis familiaris*,

Sus scrofa e *Gallus gallus*. Em *Lu. evansi*, foram encontrados fragmentos de DNA de sangue de *Canis familiaris*, *Sus scrofa* e *Gallus gallus*.

1.5 Leishmaniose Cutânea não Ulcerada ou Atípica na América Central

A leishmaniose cutânea não ulcerada se apresenta, clinicamente, com a presença de pápulas, nódulos, verruga e placas eritematosas indolores, com evolução crônica, circundadas por halo hipopigmentado (SANDOVAL PACHECO *et al.*, 2018).

Na América Central, em países como El Salvador, Honduras, Nicarágua e Costa Rica, existem vários relatos que descrevem lesões cutâneas nodulares atípicas, originalmente, descritas como lepra tuberculóide nodular. No entanto, *Leishmania* spp tem estado presente nas lesões do tipo tuberculóide. Atualmente, são consideradas como manifestações atípicas de leishmaniose cutânea (ABRAHAM *et al.*, 1999; BELLI *et al.*, 1999; CONVIT *et al.*, 2005; PONCE *et al.*, 1991; ZELEDON *et al.*, 1989). As lesões não ulceradas progridem lentamente e contém poucos parasitas; e ocorrem com maior frequência em áreas expostas do corpo.

Inicialmente, *L. (L.) infantum chagasi* foi a espécie isolada das lesões de pele de leishmaniose cutânea não ulcerada, porém os isolados de *L. (L.) infantum chagasi* destas lesões e de pacientes com a forma visceral não puderam ser diferenciadas por análise de isoenzimas (NOYES *et al.*, 1997; PONCE *et al.*, 1991).

1.6 Distribuição das Leishmanioses em Honduras

Em Honduras, existem quatro formas clínicas de leishmaniose determinadas por suas características clínicas, pela distribuição geográfica, número de espécies de parasitas e vetores envolvidos. As formas clínicas de maior interesse no nosso estudo são a leishmaniose visceral e a leishmaniose cutânea atípica, ambas causadas por *L. (L.) infantum chagasi*.

1.6.1 Leishmaniose Visceral (LV)

A leishmaniose visceral (LV) afeta, principalmente, crianças menores de 5 anos e constitui a forma mais grave por causa da sua alta taxa de mortalidade. Apresenta-se com febre, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e pancitopenia (PONCE *et al.*, 1991). A zona endêmica da LV abrange os Estados de Choluteca, Valle, região sul de Francisco Morazán, El Paraíso, La Paz, Intibucá e Lempira, região sul de Honduras (Sosa-Ochoa, Dados não publicados).

1.6.2 Leishmaniose Cutânea Não Ulcerada (LCNU)

É denominada também como Leishmaniose Cutânea Atípica (LCA) (PONCE *et al.*, 1991). Esta forma clínica é caracterizada por lesões cutâneas que não apresentam ulceração; de pequeno tamanho e pouco numerosas, afetam a pele em forma de pápulas, nódulos e placas eritematosas indolores e cercadas por um halo hipopigmentado (IEIPAV, 2009; MATUTE *et al.*, 2009) (Figura 3). É observada na mesma região onde são descritos os casos de leishmaniose visceral, no sul de Honduras (IEIPAV, 2009; SANDOVAL PACHECO *et al.*, 2018).

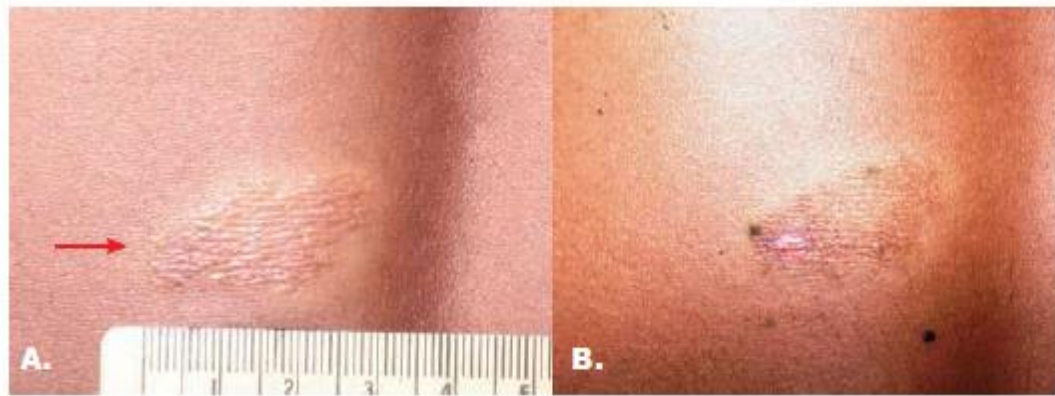


Figura 3: Leishmaniose cutânea atípica. A. Placa cor pele, elevada, cercada de halo hipopigmentado. B. Placa pós-tratamento. Observe-se o aplanamento e a atrofia da lesão (CASTRO *et al.*, 2008)

1.6.3 Leishmaniose Cutânea Ulcerada (LCU)

É caracterizada pela presença de uma ou mais lesões cutâneas que começam com mácula ou pápula eritematosa, aumentando de tamanho e, com progressão para lesões ulceradas ou com crosta de úlcera, lesões superficiais com aparência arredondada, fundo limpo e granuloso, não doloroso, com bordas bem definidas e ligeiramente salientes, com secreção seroso sem sangramento (DAVID; CRAFT, 2009). A zona endêmica da leishmaniose cutânea ulcerada abrange os Estados de Santa Barbara, Cortes, Atlantida, Colón, Gracias a Dios, Olancho e El Paraiso (Figura 4) (Sosa-Ochoa, Dados não publicados).

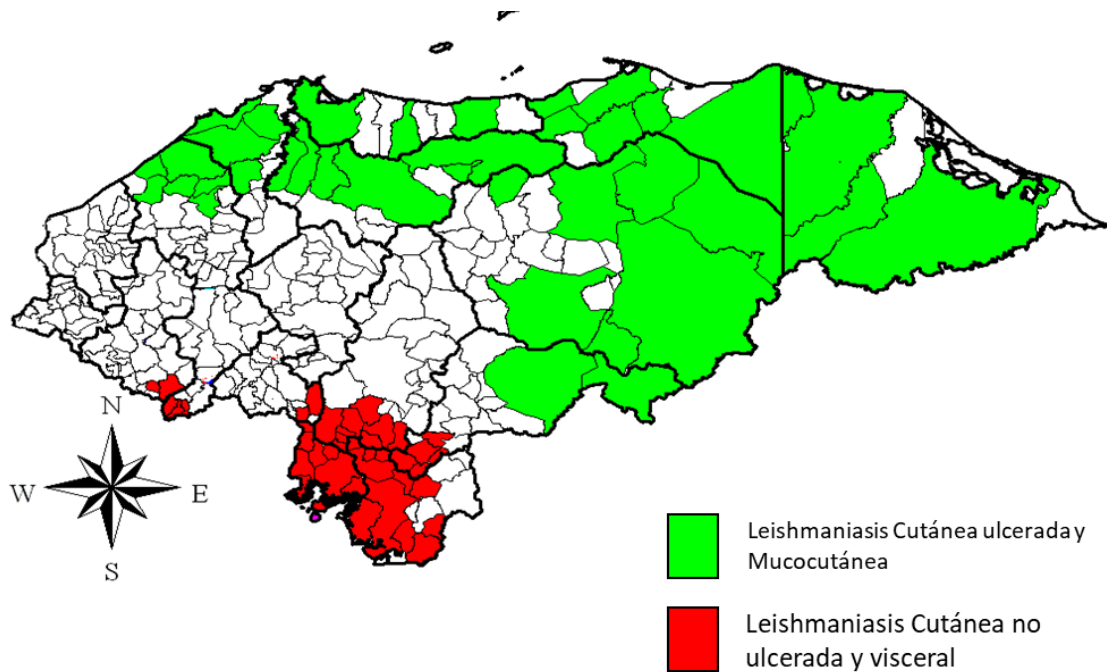


Figura 4: Distribuição geográfica da leishmaniose Tegumentar e Visceral em Honduras.

1.6.4 Espécies de *Leishmania* descritas em Honduras

***Leishmania (V.) braziliensis*:** está associada tanto com a forma cutânea ulcerada como com a forma mucocutânea em Honduras. (IEIPAV, 2009; MATUTE *et al.*, 2009).

***Leishmania (V.) panamensis*:** tem sido identificada somente nos pacientes com leishmaniose cutânea ulcerada (IEIPAV, 2009; MATUTE *et al.*, 2009).

***L. (L.) infantum chagasi*:** é responsável pela leishmaniose visceral e é o principal agente etiológico da forma cutânea não ulcerada no sul de Honduras (MATUTE *et al.*, 2009; NOYES *et al.*, 1997; PONCE *et al.*, 1991; SOSA-OCHOA *et al.*, 2014)

Leishmania (L.) mexicana: Produz lesões cutâneas ulceradas e não ulceradas, clinicamente indistinguíveis das ocasionadas por *L. (L.) infantum chagasi*, contribuindo em menor proporção, para o número de casos de LCA (IEIPAV, 2009; MATUTE *et al.*, 2009; NOYES *et al.*, 1997).

1.6.5 Epidemiologia da leishmaniose cutânea não ulcerada em Honduras

A leishmaniose cutânea localizada é endêmica na América Central. Nas últimas três décadas tem sido observada uma nova variante de leishmaniose cutânea localizada na zona sul de Honduras, constituída por lesões não ulceradas que afetam predominantemente o rosto e as extremidades em forma de pápulas, nódulos e placas assintomáticas de evolução crônica, denominada de leishmaniose cutânea atípica (LCA) (ABRAHAM *et al.*, 1999; BELLI *et al.*, 1999; CAMPOS-PONCE *et al.*, 2005; CONVIT *et al.*, 2005; PONCE *et al.*, 1991). A primeira descrição desta forma clínica ocorreu na Ilha del Tigre, município de Amapala, quando Ponce e colaboradores observaram as lesões cutâneas em crianças e adolescentes aparentemente com um bom estado nutricional (PONCE *et al.*, 1991). Posteriormente, encontraram novos casos desta forma atípica em outras áreas endêmicas da forma visceral da doença (CARRASCO *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 2008; NOYES *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2006; SOSA-OCHOA *et al.*, 2014). Em Honduras, as diferentes formas clínicas da leishmaniose se distribuem de forma endêmica em várias zonas geográficas. A variante cutânea não ulcerada afeta populações rurais que se localizam em zonas semidesérticas e secas que se estabeleceram em lugares precários, onde o vetor se encontrava no seu hábitat natural. Os Estados de Choluteca, Valle, El Paraíso, La Paz, Intibucá, Lempira e o sul de Francisco Morazán, no Sul do país, são considerados

endêmicos. Nestas áreas, o cão tem sido considerado um reservatório importante do parasita, embora mais estudos sejam necessários para comprovar seu verdadeiro papel na manutenção da enzootia (PONCE *et al.*, 1991).

De acordo com a Secretaria de Saúde, durante o período de 2009-2016, 6.055 casos de LCNU foram confirmados em 12 dos 18 Estados de Honduras. O Estado com maior número de casos foi Choluteca com 3.450 (59,9%), seguido por Valle 1.266 (20,9%) e Francisco Morazan 607 (10,02%). O ano que relatou um maior número de casos foi de 2015 com 975 casos reportados (taxa de incidência de 1,58 / 10.000 habitantes).

Santos e colaboradores (2006) avaliaram 438 escolares do Município de Reitoca, no Estado de Francisco Morazán. Do total dos estudantes, 121 (27,6%) apresentaram lesões clínicas compatíveis com LCNU e 98 estudantes foram selecionados para diagnóstico laboratorial, que foi feito através da observação de formas amastigotas do parasita em esfregaço de lesão de pele, sendo que em 55 (56,1%), foi confirmada a presença do parasita. A prevalência de LCNU diagnosticada clinicamente e confirmada pelos exames laboratoriais foi de 12,6%.

Em seguida, Lizardo Castro e colaboradores (2008) estudaram 27 pacientes com LCNU, 17 homens e 10 mulheres dos Estados de Francisco Morazán, Valle, Choluteca, El Paraiso e Comayagua. Em relação ao tipo e localização das lesões, 23 dos 27 pacientes apresentaram lesões no rosto, do tipo de pápulas, nódulos e placas, não ulceradas, arredondadas ou ovaladas com eritema leve ou eritematosas, algumas hipocrômicas, e com frequência mostraram um halo de despigmentação (Figura 3 e Figura 5). Os 27 pacientes tiveram diagnóstico clínico de LCNU e isolamento do parasita. Por meio de anticorpos monoclonais foram identificadas 26 cepas do complexo *Leishmania donovani* e uma cepa do complexo *Leishmania mexicana*. A

caracterização das espécies por análise de isoenzimas foi realizada em 11 casos: *Leishmania chagasi* (10 casos) e *Leishmania mexicana* (1 caso). Todos os isolados de *Leishmania chagasi* procederam de áreas endêmicas de leishmaniose visceral. O único caso de *Leishmania mexicana* procedia da aldeia de Piedras Azules, município de Comayagua, Estado de Comayagua, que não é área endêmica para leishmaniose visceral.

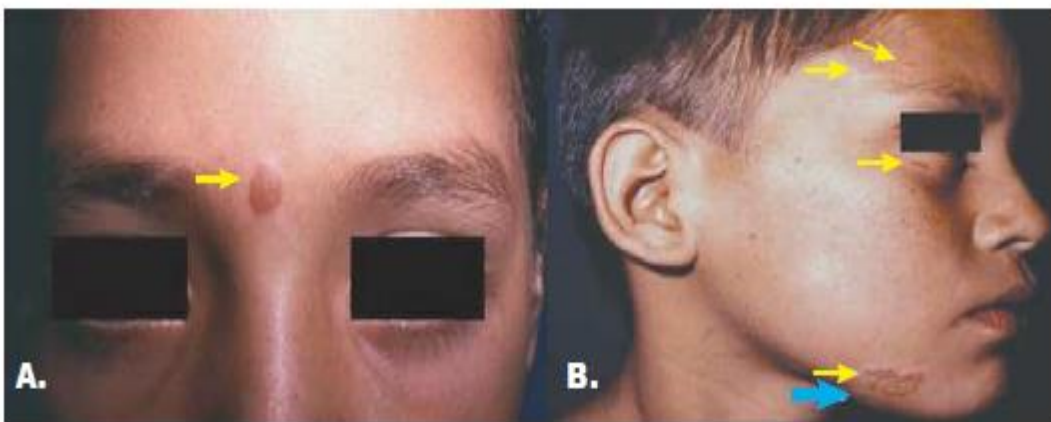


Figura 5: Diferentes apresentações clínicas de leishmaniose cutânea atípica em Honduras. A: Lesão nodular, elevada, eritematosa de superfície lisa. B: Múltiplas lesões em forma de pápulas na fronte (seta amarela) e placas na região mandibular (seta azul) (CASTRO *et al.*, 2008)

Morales Cortedano e colaboradores, em 2012, descreveram a ecoepidemiologia da LCA na Ilha del Tigre. Por meio da busca ativa de casos, estudaram 38 casos compatíveis de LCNU. Eles observaram uma proporção de 1:1 em relação ao sexo dos pacientes, sendo que o maior número de casos foi encontrado na faixa etária maior de 15 anos. Nos 38 casos clinicamente observados, formas amastigotas do parasita foi encontrada no exame microscópico e a identificação *L. (L.) infantum chagasi* por PCR comprovou a etiologia da forma clínica.

A Ilha de Amapala, na região sul de Honduras, tem sido uma área de estudo para LCNU por apresentar condições macroambientais adequadas para a manutenção da doença compatíveis com outras áreas endêmicas para LCA em

Honduras e em outros países da América Central como Nicarágua e Costa Rica (CAMPOS-PONCE *et al.*, 2005; NOYES *et al.*, 1997; PONCE *et al.*, 1991).

Recentemente, Sosa-Ochoa e colaboradores (2014) descreveram a ecoepidemiologia da LCNU em 2 municípios do Estado de Valle (Amapala e San Francisco del Coray) e 2 municípios do Estado de Francisco Morazán (Reitoca e Alubaren). Neste estudo, foram coletadas 156 amostras de pacientes com suspeita clínica de LCNU, em 130 amostras foram encontrados fragmentos de DNA de *Leishmania* spp e em 128 amostras foi identificada *L. (L.) infantum chagasi* como o agente etiológico da forma clínica. Em relação às condições macroambientais, os quatro municípios compartilham a zona de vida, segundo Holdrige, que corresponde à uma floresta tropical seca. Os solos são de tipo Ustorthents líticos e a faixa da temperatura é de 35-39 °C. Estas características macroambientais são similares com outras zonas endêmicas para LCA descritas na Nicarágua (CONVIT *et al.*, 2005) e em Costa Rica (ARGÜELLO VARGAS, 2006; CARRILLO *et al.*, 2010; CONVIT *et al.*, 2005). Estas características ecológicas permitem que alguns autores proponham a teoria de que este tipo de doença encontra-se circunscritas a zonas geográficas definidas (CARRILLO *et al.*, 2010; REYES *et al.*, 2011).

1.7 Patogenia e Imunidade da Leishmaniose Visceral

As bases imunológicas da resposta imune nas leishmanioses ainda não são completamente compreendidas. A espécie *Leishmania major* tem sido o modelo para entender a dicotomia da resposta imune desenvolvida em hospedeiros vertebrados (MULLER *et al.*, 1989; REINER; LOCKSLEY, 1995). A imunidade protetora na

leishmaniose é dependente do desenvolvimento de resposta imune celular do tipo I, que é caracterizada, principalmente, pela produção inicial de Interleucina-12 (IL-12) por células apresentadoras de antígenos (APCs), que induzem a produção de Interferon- γ (IFN- γ) pelas células Th1 (MULLER *et al.*, 1989). Desta forma, as células Th1 irão induzir a ativação dos mecanismos microbicidas do macrófago; principalmente, levando à produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS, que incluem os íons de oxigênio, radicais livres e peróxidos), moléculas altamente eficazes em controlar o número de amastigotas intracelulares (KAYE; SCOTT, 2011). Porém, há relatos mostrando que a LV progride, mesmo na presença de níveis detectáveis de citocinas do tipo Th1, cuja ação é neutralizada por fatores imunossupressores, como a IL-10 (NYLÉN; SACKS, 2007). Ainda não se sabe completamente quais tipos de células são responsáveis por estimular a produção de IL-10 pelas células T durante a LV ativa; no entanto, estudos recentes associam a participação de células B produtoras de IgE durante a progressão de LV (SCHAUT *et al.*, 2016). Importante salientar que a IL-10 e, eventualmente, a apoptose de células T, podem ser responsáveis pela diminuição da patologia causada pela inflamação na LV.

Em relação à patogenia da leishmaniose visceral humana, a literatura tem relatado um espectro de manifestações clínicas-imunológicas, que pode ser responsável por diferentes formas clínicas, que podem variar desde, uma forma assintomática da infecção observada, principalmente, em indivíduos residentes em zonas endêmicas de transmissão de *L. (L.) infantum chagasi*, indivíduos que conseguem montar uma boa resposta imune do tipo celular, caracterizada pelo teste de hipersensibilidade tardia positivo (intradermorreação de Montenegro) (CRESCENTE *et al.*, 2009; JERONIMO; HOLST; *et al.*, 2007; SOSA-OCHOA *et al.*,

2020b); até uma forma sintomática da infecção que é caracterizada por uma supressão da resposta imune celular que pode levar a uma progressão da forma clássica da leishmaniose visceral até o óbito quando não diagnosticada e tratada a tempo (NYLÉN; SACKS, 2007). Estes estudos têm empregado, principalmente, ensaios imunológicos que avaliam a resposta imune humoral através da determinação de imunoglobulinas em soros e testes que avaliam a resposta imune celular, como o teste intradérmico de Montenegro, determinando a resposta de hipersensibilidade tardia frente a antígeno específico (SILVEIRA *et al.*, 2010a).

1.7.1 Imunopatologia da Leishmaniose Cutânea Não Ulcerada

A imunopatologia das leishmanioses e, especificamente a LCNU, é fortemente influenciada por fatores inerentes ao hospedeiro vertebrado, como o perfil genético e imunológico; ao mesmo tempo pode ser influenciada por fatores inerentes ao parasito, como a virulência e a espécie de *Leishmania* infectante, assim como por fatores inerentes ao vector, como sua capacidade vetorial e a presença das espécies vetoras secundárias (SILVEIRA *et al.*, 2008). Importante salientar que, o desenvolvimento de uma imunidade protetora está intimamente relacionado a uma ação coordenada entre as células de imunidade inata e adaptativa (RODRIGUES *et al.*, 2016).

L. (L.) infantum chagasi é o agente etiológico da LV nas Américas. No entanto, na América Central, especificamente, em El Salvador, Honduras, Nicarágua e norte da Costa Rica, esta espécie também pode causar a leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica, que é caracterizada por lesões que variam de 3 a 5 mm, na maioria dos casos, única e de evolução crônica e bastante lenta (SANDOVAL

PACHECO *et al.*, 2018; SOSA-OCHOA *et al.*, 2020b). É importante notar que há pouca informação sobre a imunidade desenvolvida nesta forma clínica de infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi*, alguns estudos realizados no começo do século XXI, descreveram por meio de análise histopatológica a presença de granulomas formados quase, exclusivamente, por macrófagos com diferentes graus de diferenciação epiteloide (CONVIT *et al.*, 2005); e a quantificação das subpopulações linfocitárias (CD4 e CD8), onde os autores descrevem um aumento significativo no número de células CD8 em comparação com os controles normais (ABRAHAM *et al.*, 1999).

Os estudos mais recentes realizados por nosso grupo têm demonstrado que as lesões cutâneas encontradas nos pacientes com LCNU são caracterizadas por infiltrado inflamatório linfo-histiocitário de intensidade variável com disposição difusa e, ocasionalmente, associado a granulomas epiteloídes (SANDOVAL PACHECO *et al.*, 2018). O infiltrado inflamatório foi caracterizado por imuno-histoquímica onde se observou que é formado principalmente por linfócitos TCD8⁺, seguido dos macrófagos do subtipo M1, linfócitos TCD4⁺ (possivelmente do tipo Th-17) e uma resposta mediada pela principal citocina pro-inflamatória, IFN- γ (ARAUJO FLORES *et al.*, 2020; SANDOVAL *et al.*, 2021; SANDOVAL PACHECO *et al.*, 2021). Além disso, foi avaliada em pacientes acometidos pela LCNU, a resposta imune celular sistêmica, através do teste intradérmico de Montenegro e resposta imune humoral pela determinação de IgG e IgM por ELISA, observando-se que a maioria dos pacientes tem uma boa resposta imune celular caracterizada por teste de Montenegro positivo em mais de 50% dos pacientes, o que confere uma resistência parcial que, possivelmente, está sendo modulada na pele, pela presença de células T reguladoras FoxP3⁺, citocinas regulatórias, especialmente TGF- β evitando o dano tecidual e levando a uma baixa

persistência parasitária tecidual, que limita a produção de imunoglobulinas tipo IgG e IgM (ARAUJO FLORES *et al.*, 2018; SOSA-OCHOA *et al.*, 2020b).

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses representam um largo espectro de manifestações clínicas, dependendo da espécie do parasito infectante, da resposta imune do hospedeiro e, possivelmente, de fatores da saliva do inseto vetor. Em Honduras, são descritas quatro formas clínicas de leishmaniose: leishmaniose cutânea ulcerada, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica. As formas de leishmaniose cutânea difusa e recidivante são bastante raras. Nas Américas, a *L. (L.) infantum chagasi* causa manifestações subclínicas e leishmaniose visceral ativa (LV), que se não tratada é potencialmente fatal (CRESCENTE *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2010a).

Entretanto, em alguns países da América Central, entre eles, Honduras, a infecção humana, por *L. (L.) infantum chagasi*, tem apresentado um comportamento atípico, ora causando leishmaniose cutânea em adolescentes e adultos jovens (BELLI *et al.*, 1999; CAMPOS-PONCE *et al.*, 2005; CONVIT *et al.*, 2005; NEVA *et al.*, 1997), ora causando leishmaniose visceral em crianças menores de dez anos, embora tenha sido confirmado através de diagnóstico molecular que os parasitos de ambas as formas clínicas da doença são semelhantes genotipicamente (NOYES *et al.*, 1997). Porém, a presença das duas formas clínicas da doença causada por *L. (L.) infantum chagasi*, a visceral e a cutânea atípica, em uma mesma área geográfica, sugere que fatores da imunidade do hospedeiro possam estar envolvidos na determinação dessas diferentes formas clínicas (CASTRO *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2006). Deve ainda ser ressaltado que os estudos referentes à leishmaniose cutânea atípica na América Central são bastante escassos na literatura e os poucos relatos datam do final da

década de 80 e começo da década de 90, quando esta forma clínica rara foi descrita pela primeira vez.

Assim, baseado em estudos prospectivos desenvolvidos em área endêmica de leishmaniose visceral no estado do Pará, região norte do Brasil, que descreveu a evolução clínica-imunológica da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi*, através da reação de hipersensibilidade tardia (DTH) para avaliar a imunidade celular e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para avaliar a imunidade humoral (SILVEIRA *et al.*, 2010a) o presente estudo, tem como propósito avaliar as respostas imunes humoral e celular empregando as mesmas ferramentas, em indivíduos residentes em área endêmica de transmissão de *L. (L.) infantum chagasi* em Honduras, na tentativa de compreender melhor a patogenia da infecção causada por esta espécie de parasito na América Central, assim como acompanhar a coorte definida no estudo por um período de dois anos para avaliar a evolução clínica-imunológica dos indivíduos.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o espectro clínico-imunológico da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* em Honduras.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a prevalência e incidência da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* em indivíduos residentes no município da Amapala.
- Analisar a evolução da resposta imune, humoral e celular em indivíduos sintomáticos e assintomáticos acometidos pela infecção por *L. (L.) infantum chagasi*.
- Identificar a dinâmica da evolução dos perfis clínico-imunológicos determinados pela infecção por *L. (L.) infantum chagasi* no município da Amapala.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

Estudo epidemiológico, do tipo prospectivo, que avaliou uma coorte de 576 indivíduos, residentes em área endêmica de leishmaniose cutânea não ulcerada e leishmaniose visceral da costa pacífica de Honduras, América Central, no período de 2017 -2019.

4.2 Área do estudo

O estudo foi desenvolvido no Município de Amapala ($13^{\circ}15'37,1''N$ $87^{\circ}37'27,8''W$) (Figura 6) que pertence ao Estado de Valle, com uma área de 80,7 km². Trata-se de duas ilhas, Zacate Grande e El Tigre, localizadas ao sul de Honduras no Golfo de Fonseca; composto de 28 aldeias, com uma população estimada de 13.302 indivíduos em 2017 (INE, 2018).

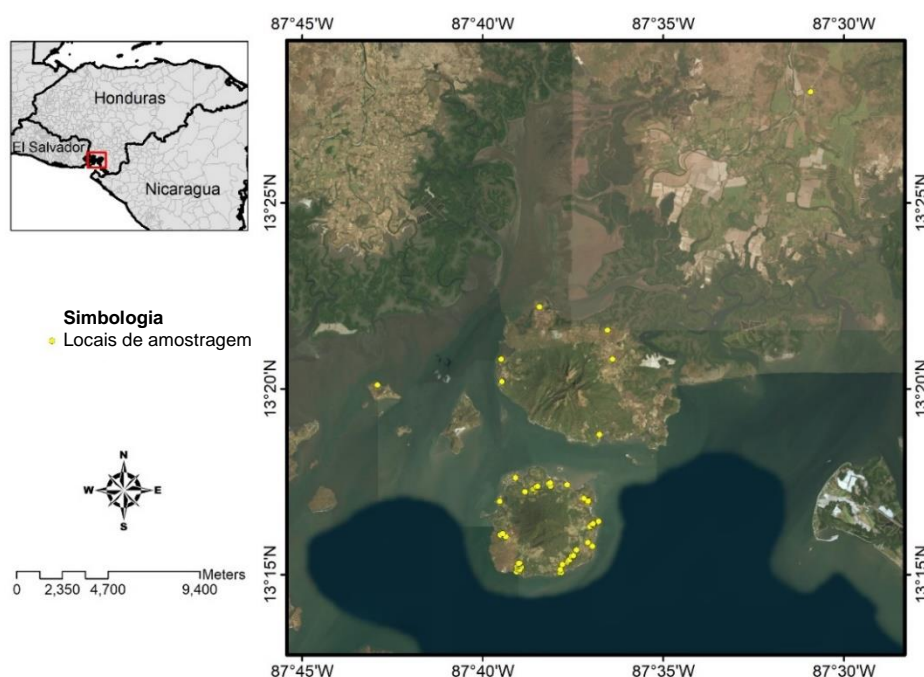


Figura 6: Mapa de localização do município de Amapala (mapa elaborado por Cesar Rios)

A cobertura vegetal foi identificada pelo Sistema Holdrige, como sendo correspondente à floresta tropical seca. Segundo a classificação da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), os solos são líticos, associados a rochas ígneas ácidas ou metamórficas em topografia montanhosa, de classe vulcânica. A temperatura varia entre 25°C a 35°C, tem uma precipitação média anual de 2.096 mm, a topografia montanhosa e acidentada tem uma altitude média de 44 metros. No entanto, o ponto mais alto da ilha é de 760 metros, com solo argiloso, pântanos e brejos (SOSA-OCHOA *et al.*, 2014). A paisagem ecológica muda, notavelmente, entre os meses secos (novembro-maio) (Figura 7a) e os meses chuvosos (junho-outubro) (Figura 7b).



(a)



(b)

Figura 7: Zona de vida identificada em relação ao Sistema Holdrige. (a) meses secos; (b) meses chuvosos.

As características microambientais das casas mostram que há homogeneidade nas variáveis microambientais das residências do município de Amapala. A maioria das casas nas aldeias são de adobe ou madeira, telhado de zinco (Figura 8a), têm eletricidade, mas falta saneamento básico. A maioria das casas tem algum tipo de animal doméstico, sendo o cão o mais predominante entre eles (Figura 8b).



(a)



(b)

Figura 8: (a) Tipo comum de moradia rural; (b) cães ao redor da moradia.

4.3 População estudada

Os indivíduos foram convidados a participar do projeto, em coordenação com o diretor da Unidade de Saúde do município de Amapala. Antes dessa atividade, o projeto foi socializado com o governo local, a fim de coordenar o apoio das localidades na detecção e monitoramento dos casos que recrutamos para os propósitos do estudo. A amostragem foi feita por busca ativa, casa a casa, para agregar um maior número de indivíduos e permitir o acompanhamento das duas incidências (12 e 24 meses após a prevalência). A população incluída no estudo foi constituída de 576 indivíduos, sendo 336 do sexo feminino e 240 do sexo masculino, com idade superior a um ano. A população foi dividida em três grupos de acordo com a faixa etária: 1-10, 11-20 e maior ou igual a 21 anos.

O objetivo do estudo foi apresentado a cada indivíduo, e somente os que concordaram em participar foram incluídos no estudo, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICES 2 e 3).

4.4 Tipo de amostragem

O tipo de amostragem foi probabilística e aleatória. Para calcular o tamanho da amostra, foi usado o programa estatístico WinEpiscope, que calcula através do método de Thrusfield (THRUSFIELD, 2007), empregando a seguinte equação:

$$n = \frac{(p_1 \cdot q_1 + p_2 \cdot q_2) \cdot K}{(p_1 - p_2)^2} \quad p_2 = \frac{p_1}{RR}$$

Onde:

- n = número indivíduos necessários para cada grupo
- $K = [Z(a) + Z(b)]^2$
- Z(a) = valor de t de Student para o nível de confiança indicado
- Z(b) = valor de t de Student para a potência indicada
- p1 = proporção esperada em indivíduos não expostos
- $q_1 = 1 - p_1$
- p2 = A incidência mínima para detectar em indivíduos expostos
- $q_2 = 1 - p_2$
- RR = Risco relativo estimado de importância suficiente.

Desta forma, estimou-se que a população envolvida neste estudo deveria ser constituída de uma coorte de, aproximadamente, 576 indivíduos, de ambos os sexos, com idade maior ou igual a 1 ano.

4.5 Avaliação clínica

Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação clínica, sendo considerados os sinais clínicos sugestivos de leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea atípica. Os dados clínicos, assim como dados epidemiológicos, foram anotados em uma ficha

clínica para posterior correlação com os achados nos testes de imunidade humoral e celular.

4.6 Coleta de amostras

Amostras de soro foram obtidas por meio de punção venosa utilizando-se agulhas e tubos Vacutainer®. Pelo menos 4 mL de sangue foram coletados para obtenção de soro. Todas as amostras foram transferidas para o Centro de Pesquisa Genéticas (CIG) da Universidade Nacional Autônoma de Honduras sob condições adequadas de refrigeração e armazenadas a -70 °C até o seu processamento.

4.7 Desenho do estudo

Considerando que o presente estudo teve como meta analisar a prevalência e a incidência da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi*, assim como, a dinâmica da evolução dos seus perfis clínico-imunológicos, foi necessário planejar um estudo prospectivo com o propósito de acompanhar a coorte durante o período de dois anos. Para este fim, os testes imunológicos de ELISA e DTH foram empregados para determinar a prevalência e a incidência da infecção, juntamente com o diagnóstico parasitológico, nos casos de infecção cutânea suspeita. Nas incidências (12 e 24 meses após a prevalência), os testes foram realizados, somente, nos indivíduos negativos na prevalência e na primeira incidência, considerando a segunda incidência. Neste sentido, os casos com reatividade somente para a DTH, que representam caráter genético de resistência à infecção (JERONIMO; DUGGAL, *et al.*, 2007), foram

removidos das avaliações imunológicas subsequentes, conforme estudo prospectivo feito no Sudão (ZIJLSTRA *et al.*, 1994). Além disso, os casos com reatividade para ambos os testes só foram testados novamente pelo teste de ELISA. Finalmente, os casos de reatividade somente na reação de ELISA, que pode representar um estado mais relacionado com a susceptibilidade ou representar uma infecção recente, permaneceram sob investigação pelos dois testes, com objetivo de analisar a evolução das respostas imunes, humoral e celular (SILVEIRA *et al.*, 2010a; SILVEIRA *et al.*, 2010b).

4.8 Procedimentos dos testes imunológicos

4.8.1 Reação Intradérmica de Montenegro ou Teste de Hipersensibilidade

Tardia (DTH)

O procedimento e a utilização do teste de Montenegro (DTH) foi, previamente, descrito e discutido em estudos de leishmaniose tegumentar americana e leishmaniose visceral (SILVEIRA *et al.*, 1998; SILVEIRA *et al.*, 1991). No sentido de aumentar a especificidade do teste, foi empregado antígeno espécie-específico, neste caso, formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (MCAO/BR/2003/M22697) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os parasitas em fase estacionária de crescimento em cultura foram lavados e fixados em solução de mertiolato (1/10.000) na concentração final de 10^7 promastigotas/mL e armazenados em frascos de 2 mL a 4°C. Um volume de 0,1 mL de suspensão de antígeno foi administrado, por via intradérmica, no antebraço de cada indivíduo. Após 48 horas, a reação intradérmica foi avaliada, sendo considerada positiva a formação

de nódulo maior ou igual a 5 mm de diâmetro. Volume igual de solução de mertiolato 1/10.000 sem antígeno de *Leishmania* foi administrado por via intradérmica ao antebraço contralateral de cada indivíduo como controle negativo.

4.8.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

O ELISA foi realizado de acordo com Hirata e colaboradores (HIRATA *et al.*, 2019). Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µL de antígeno bruto de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/HN/2017/AMA-73), na concentração de 5 µg/poço, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6. As placas foram incubadas durante a noite a 4 °C. Após 3 lavagens com solução salina tamponada com fosfato 0,05% Tween-20 (PBS-T), os sítios de ligações inespecíficas foram bloqueados com 150 µL de solução de leite em pó desnatado a 10% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 1 hora a 37 °C em uma câmara úmida. Após a lavagem das placas, soros das amostras em duplicata e controles diluídos 1:400 em PBS-T foram adicionados no volume de 100 µL por poço. Após incubação a 37 °C por 1 hora, as placas foram lavadas novamente, e os conjugados peroxidado anti-IgG humana (Calbiochem) na diluição de 1:50.000 e anti-IgM humana (Calbiochem) na diluição de 1:20.000 foram adicionados no volume de 100 µL/poço, sendo as placas novamente incubadas a 37 °C por 45 minutos. Após lavagem das placas, a reação foi finalizada pela adição de 100 µL/poço do substrato 3,3', 5,50' tetrametilbenzidina (TMB) (B&D) e mantida por 15 minutos em temperatura ambiente em câmara escura. A reação foi interrompida com 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2N, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro em filtro de 450 nm. Os valores de absorbância observados foram corrigidos subtraindo o valor de absorbância do branco. Para estabelecer a linha de

corde da reação, os valores médios de absorvância obtidos para soros de controle negativo foram aumentados duas vezes pelo seu desvio padrão. Amostras com valores de absorvância inferiores ao valor de corte da reação foram consideradas negativas, e amostras com valores acima do valor de corte foram consideradas positivas.

Para a determinação das subclasses de IgG (IgG1/IgG2), as placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µL de antígeno bruto de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/HN/2017/AMA-73) na concentração de 10 µg/mL para IgG1 e IgG2 diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6. As placas foram incubadas durante a noite a 4 °C. Após 3 lavagens com solução salina tamponada com fosfato 0,05% Tween-20 (PBS-T), os locais de ligação não específicos foram bloqueados com 150 µL de solução de leite em pó desnatado a 10% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 1 hora a 37 °C em uma câmara úmida. Após a lavagem das placas, soros das amostras em duplicata e controles diluídos 1:50 para IgG1 e 1:25 para IgG2 em PBS-T foram adicionados no volume de 100 µL por poço. Após incubação a 37 °C por 1 hora, as placas foram lavadas novamente, e o conjugado peroxidado anti-IgG1 humana (Calbiochem) na diluição de 1:1.000 ou e anti-IgG2 humana (Calbiochem) na diluição de 1:500 foram adicionados em 100 µL/volume de poço, e as placas foram incubadas a 37 °C por 45 minutos. Após a lavagem das placas, a reação foi finalizada pela adição de 100 µL/poço do substrato 3,30', 5,50' tetrametilbenzidina (TMB) (B&D) e mantida por 15 minutos em temperatura ambiente em câmara escura. A reação foi interrompida com 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2N, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro em filtro de 450 nm. Os valores de absorvância obtidos foram corrigidos subtraindo o valor de absorvância do branco. Para estabelecer a linha de corte da reação, os valores médios de absorvância obtidos para soros de controle

negativo foram aumentados duas vezes pelo seu desvio padrão. Amostras com valores de absorbância inferiores ao valor de corte da reação foram consideradas negativas, e amostras com valores acima do valor de corte foram consideradas positivas (LARANJEIRA *et al.*, 2014).

4.9 Critérios de identificação da infecção humana

A definição de infecção ou exposição humana por *L. (L.) infantum chagasi* foi determinada por exame clínico, diagnóstico parasitológico e presença de reatividade em um ou ambos os ensaios imunológicos (ELISA-IgM / IgG e DTH).

4.10 Avaliação clínica e laboratorial dos indivíduos infectados

Todos os indivíduos com reatividade nos testes de ELISA e/ou DTH foram acompanhados clinicamente, com a finalidade de serem observados o aparecimento de sinais e/ou sintomas compatíveis com a LV e/ou LCNU. Nos casos suspeitos de leishmaniose cutânea atípica, os indivíduos foram submetidos ao exame parasitológico direto, a fim de ser confirmada a etiologia leishmaniótica da doença. Após esta confirmação, foi feita uma PCR-RFLP em material biológico obtido através de raspado de lesão de pele para caracterizar as espécies de *Leishmania* presente nas lesões dos pacientes.

4.11 Diagnóstico molecular e caracterização de espécies de parasitas de *Leishmania*

Kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, EUA) foi usado para extração de DNA de amostras de sangue seguindo as instruções do fabricante. O DNA de amostras obtidas de raspados de lesões cutâneas foi extraído usando Chelex 5% (Bio-Rad Lab Inc., Hercules, EUA).

Para identificar o gênero *Leishmania*, os primers LEISH-1: 5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3' e LEISH-2: 5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3' foram usados fornecendo um produto de kDNA de 120 pb (FRANCINO *et al.*, 2006). As amplificações foram realizadas com um kit comercial (Master Mix 2x - Promega). Cada reação foi realizada pela adição de 4 µL de ADN alvo e 0,6 µmol/L de cada primer em um volume final de 20 µL. As amplificações consistiram em um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min. A segunda etapa de 40 ciclos consistiu em desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento a 60 °C por 20 s e extensão a 72 °C por 1 min, seguido por um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 min. Os resultados foram observados em gel de agarose 2%, previamente submetido a eletroforese 100 V por 1 h.

Para caracterizar as espécies de *Leishmania*, foi realizado PCR-RFLP direcionado a um fragmento de 234 pb do gene Hsp70 com os iniciadores Hsp70 *sense* (5' GGACGAGATCGAGCGCATGGT 3') e Hsp70 *antisense* (5' TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG 3') (GRACA *et al.*, 2012). As amplificações foram realizadas com um kit comercial (Master Mix 2x - Promega). Cada reação compreendeu 4 µL de DNA de amostra e 0,6 µmol/L de cada primer em um volume final de 20 µL. As amplificações consistiram em um ciclo inicial de desnaturação a 94

°C por 5 min. A segunda etapa consistiu na desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 59 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min por 37 ciclos. A última etapa consistiu em um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 min. Os resultados foram observados em um gel de agarose a 2% previamente submetido a uma eletroforese 100 V por 1 h. Para realizar a restrição de produtos de PCR, 15 µL do DNA amplificado foram adicionados a uma reação em tubo contendo 1 µL (10 U) de enzima *Hae* III (Promega), 2 µL de tampão de enzima de restrição 10x, 0,2 µL de BSA acetilado a 10 µg/µL e 1,8 µL de água deionizada, incubados a 37 °C por 3 h seguidos por 20 min de incubação a 80 °C para a inativação da enzima. Os perfis das espécies de cada amostra e controle de referência foram observados em gel de agarose 4% submetido à eletroforese por 3,5 h.

4.12 Resposta imune humoral e celular

Amostras de soro coletadas na prevalência, na primeira e segunda incidência e preservadas à -70 °C foram utilizadas para avaliação mais aprofundada da imunidade dos indivíduos arrolados neste estudo.

Teste de ELISA empregando antígeno específico foi utilizado para avaliação de classes (IgG e IgM) e subclasses de IgG (IgG1 e IgG2) de imunoglobulinas com o objetivo de avaliação da imunidade humoral.

Foram usados 86 soros da coorte de prevalência dos perfis assintomáticos (IAI=18; IAR=8; IAF=2), sintomáticos (ISI=9; ISR=11; ISF=8; ISP=16), controle positivo (LVA=2) e como grupo controle foram usados soros de indivíduos negativos para os testes imunológicos que residem na área endêmica (GC=12). A determinação

da concentração sérica de citocinas foi feita por citometria de fluxo empregando o kit CBA Th1/Th2/Th17 (B&D) permitindo avaliação simultânea de citocinas pró - inflamatórias (TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-17A) e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4 e IL-10).

4.13 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o pacote estatístico Stata V.12.0 (StataCorp, 2011. College Station, TX: StataCorp LP) e WinEpiscope 2.0. O teste de independência do qui-quadrado foi usado para testar as diferenças significativas na infecção entre sexo e idade dos grupos sintomáticos e assintomáticos com nível de significância de 5%. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para estimar a diferença mediana entre o tempo de progressão da doença (meses) e o número de lesões cutâneas.

O software GraphPad Prism 8.0 foi utilizado para a análise estatística dos resultados referentes a imunidade humoral e celular. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para analisar os dados de distribuição. Para analisar as diferenças entre os grupos, foi realizado o teste ANOVA de uma via. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os gráficos foram feitos usando o software Origin 9.6.5.169.

4.14 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Programa de Mestrado em Doenças Infecciosas e Zoonóticas da Escola de Microbiologia da Universidade

Nacional Autônoma de Honduras (CEI-MEIZ) com a resolução número 03-2014 (APÊNDICE 4) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o protocolo CAEE 55381216.0.0000.0065 (APÊNDICE 5).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Aspectos clínicos e demográficos da população estudada

Foram selecionados para este estudo 576 indivíduos, que foram acompanhados de abril de 2017 a junho de 2019. Do total dos indivíduos acompanhados, a maioria (55,90%) tinha idade maior que 21 anos (Tabela 1); e 336 (58,33%) indivíduos eram do sexo feminino enquanto 240 (41,67%) pertenciam ao sexo masculino (Tabela 2). Lesões cutâneas compatíveis com LCNU foram identificadas em 104 indivíduos (18%), enquanto 472 (82%) mostravam-se, clinicamente, assintomáticos. O diagnóstico parasitológico foi baseado no exame direto de esfregaço feito com material obtido de raspado das lesões de pele corados por Giemsa e observados em microscopia de luz em objetiva de 100x em imersão. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. foram observadas em 100% dos casos de LCNU, confirmando a etiologia das lesões de pele (Figura 9).

Tabela 1. Distribuição por faixa etária dos indivíduos sintomáticos, acometidos por leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU), e assintomáticos, incluídos neste estudo. Município de Amapala, Honduras, 2017.

Características	Sintomáticos (n=104)		Assintomáticos (n=472)		Total (n=576)		
	x	(%)	n	(%)	n	(%)	
	Idade (anos)						
1-10	21	20,19	38	8,05	59	10,24	
11-20	44	42,31	151	31,99	195	33,85	* $\chi^2= 20,30$; df =1; p= 0,000
≥21	39	37,50	283	59,96	322	55,90	

* Comparação entre pacientes menores de 21 anos de idade, com e sem lesões cutâneas

Tabela 2. Distribuição por sexo dos indivíduos sintomáticos, acometidos por leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU), e assintomáticos, incluídos neste estudo. Município de Amapala, Honduras, 2017.

Características	Sintomáticos		Assintomáticos		Total	
	(n=104)		(n=472)		(n=576)	
	x	(%)	n	(%)	n	(%)
Sexo						
F	69	66,35	267	56,57	336	58,33
M	35	33,65	205	43,43	240	41,67

** $\chi^2 = 3,03$; $df=1$; $p= 0,082$

** Comparação entre sexo com e sem lesões cutâneas.

A distribuição dos casos de LCNU foi maior na faixa etária entre 11 e 20 anos de idade (n = 44; 42,31%), seguida de indivíduos com 21 anos ou mais (n = 39; 37,50%) e menor em crianças entre 1 e 10 anos de idade (n = 21; 20,19%), mostrando-se não homogênea em relação faixa etária (Tabela 1). Em relação ao sexo, 66,35% (n = 69) dos casos de LCNU foi confirmado em mulheres e 33,65% (n = 35) em homens. Embora aparente com maior prevalência em mulheres, não foi observada diferença estatística no número de casos em relação ao sexo (Tabela 2). No que diz respeito à localidade, a maioria dos casos de LCNU pertenciam a indivíduos moradores da parte norte da ilha, localidades de San Pablo (24,04%), Las Pelonas (10,58%) e Punta Onda (10,58%). Vale ressaltar a grande prevalência também de Playa Grande (10,58%), localizada no sul da Ilha de Amapala (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição geográfica, por localidades, dos indivíduos sintomáticos, acometidos por leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU), e assintomáticos, incluídos neste estudo. Município de Amapala, Honduras, 2017.

Características	Localidade	Coordenadas Geográficas	Indivíduos Sintomáticos (LCNU) (n=104)		Indivíduos Assintomáticos (n=472)		Total (n=576)	
			n	(%)	N	(%)	n	(%)
			Amapala Centro	N13,293356; W87,651540	8	7,69	10	2,12
San Pablo	N13,289431; W87,641807	25	24,04	96	20,34	121	21,01	
Islitas	N13,260960; W87,623410	4	3,85	59	12,50	63	10,94	
Las Pelonas	N13,282870; W87,618000	11	10,58	29	6,14	40	6,94	
Tiguolotada	N13,262700; W87,615980	8	7,69	20	4,24	28	4,86	
Playa Negra	N13,253710; W87,650100	6	5,77	68	14,41	74	12,85	
Los Langues	N13,359536; W87,609056	9	8,65	21	4,45	30	5,21	
Puerto Grande	N13,370042; W87,640430	4	3,85	21	4,45	25	4,34	
Caracol	N13,282807; W87,658781	3	2,88	92	19,49	95	16,49	
San Carlos	N13,334952; W87,715220	2	1,92	1	0,21	3	0,52	
Playa Grande	N13,266940; W87,655970	11	10,58	6	1,27	17	2,95	
Punta Onda	N13,272660; W87,615800	11	10,58	48	10,17	59	10,24	
San Lorenzo	N13,366667; W87,266667	0	0,00	1	0,21	1	0,17	
Campo Sol	N13,293356; W87,651540	1	0,96	0	0,00	1	0,17	
Guarolita	N13,290137; W87,627655	1	0,96	0	0,00	1	0,17	

5.2 Diagnóstico parasitológico e molecular dos indivíduos acometidos por leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU)

Dos 576 indivíduos avaliados, 104 (18%) apresentavam lesões cutâneas compatíveis com LCNU. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. foram observadas em 100% dos esfregaços de raspados de lesões de pele corado por Giemsa e observados em objetiva de imersão (Figura 9).

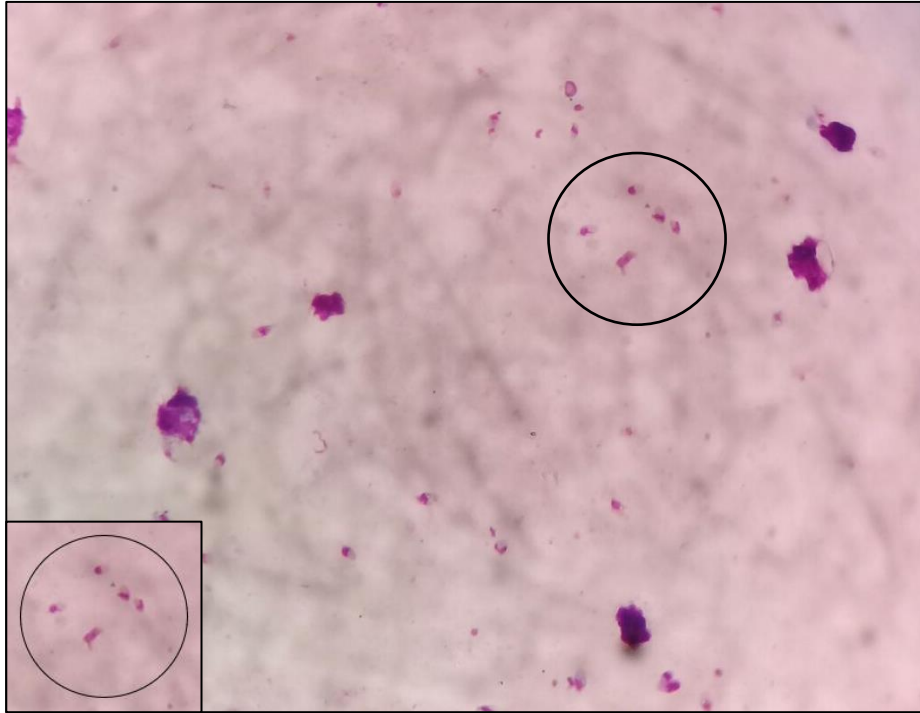


Figura 9: Fotomicrografia de esfregaço de raspado de lesão de pele de paciente com suspeita de leishmaniose cutânea não ulcerada. Formas amastigotas do parasita podem ser observadas, com destaque no círculo (Giemsa, objetiva 100x).

Para confirmação da infecção por *Leishmania*, 30 amostras de sangue periférico total e 45 amostras de raspado de lesão de pele (todas com microscopia positiva) foram submetidas a reação de PCR visando o kDNA de *Leishmania* para confirmação do gênero; e, posteriormente, para identificação da espécie foi feita a reação de PCR-RFLPs empregando a enzima *Hae* III para digestão do fragmento de Hsp70. Todas as amostras analisadas foram positivas para *Leishmania* sp. Em relação à caracterização, foi identificada *L. (L.) infantum chagasi* em 90% (27/30) das amostras de sangue e em 100% dos raspados de lesões cutâneas (45/45), confirmando *L. (L.) infantum chagasi* como agente etiológico responsável pelas lesões cutâneas de LCNU no município de Amapala, Honduras (Figura 10).

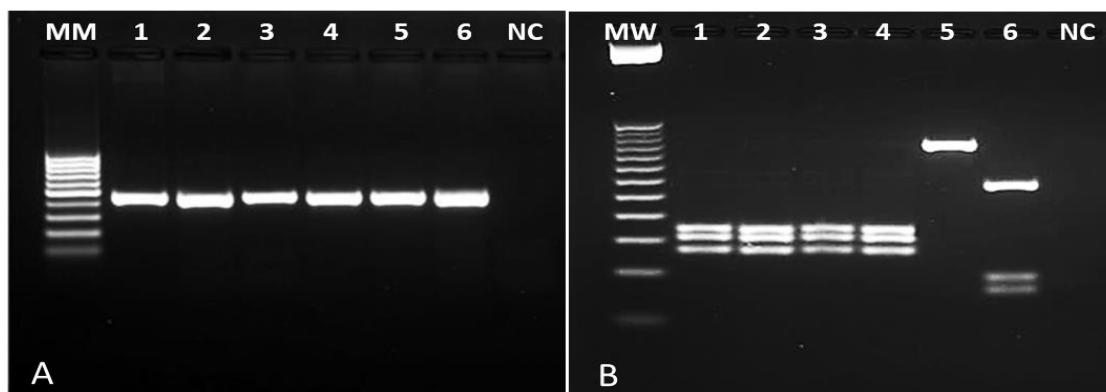


Figura 10: Fotografia de gel de agarose para amostras isoladas de pacientes LCNU. **A:** PCR gênero-específico revelando um fragmento de 120 pb do kDNA de *Leishmania*. **B:** PCR-RFLP após digestão com *Hae* III de um fragmento de Hsp70 de 234 pb. Colunas 1-3: amostras isoladas de lesão cutânea de pacientes com LCNU; Coluna 4: *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/BH46); Coluna 5: *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), Coluna 6: *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1995/M15280); NC: controle negativo; MW: padrão de peso molecular.

5.3 Características clínicas das lesões cutâneas da LCNU

Em relação às características clínicas dos pacientes acometidos pela LCNU, observamos que a maioria dos pacientes (63%, n=65) apresentava apenas 1 lesão cutânea (Tabela 4). A maioria das lesões estavam presentes em extremidades (membros superiores ou inferiores) e tórax (55% e 32%, respectivamente). De maneira geral, o tamanho das lesões era pequeno, variando de 3 a 10 mm, sendo menor que 5 mm em 65% e maior que 5 mm em 35% dos pacientes. Quanto ao tempo de evolução, 40% (n = 42) mostrava uma evolução menor que 12 meses; 22% (n = 23) uma evolução entre 1 e 2 anos, 14% (n = 14) entre 2 e 4 anos e somente 5% (n = 5) maior que 4 anos.

Importante salientar, que não houve diferença significativa ($p = 0,8920$) entre o tempo de progressão da doença (meses) e o número de lesões cutâneas.

Tabela 4. Características clínicas das lesões de pele dos pacientes acometidos pela leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU). Município de Amapala, Honduras, 2017.

Características	LCNU	
	(n) (%)	
Número de lesões		
1	65	63
2 – 3	28	27
4 – 6	8	8
> 6	3	3
*Localização (n=207)		
Face	26	13
Membros	114	55
Tórax	67	32
Tamanho (mm) (n=207)		
< 5	134	65
> 5	73	35
Evolução (meses)		
< 12	42	40
12 – 23	23	22
24 – 47	14	14
> 48	5	5
Sem informação	20	19

*Soma do número total de lesões dos pacientes.

5.4 Prevalência de infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* no município de Amapala, Honduras

A prevalência da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* em nosso estudo foi calculada baseada no diagnóstico clínico e laboratorial. Desta forma, foi considerado infectado o indivíduo que apresentasse sinais clínicos com diagnóstico parasitológico positivo (infecção sintomática – LCNU) e/ou testes positivos de imunidade humoral e/ou celular (ELISA+ / DTH+) sem sinais clínicos (infecção assintomática). Dentro da população estudada (n=576), um total de 104 indivíduos apresentou lesões cutâneas compatíveis com LCNU, sendo que a etiologia da infecção foi confirmada em 100% dos casos pelo encontro de formas amastigotas do parasita no raspado das lesões de pele, levando a uma prevalência de 18% da doença cutânea na região do estudo. Porém, entre os indivíduos assintomáticos examinados (n = 472), 320 mostraram-se positivos para um ou mais testes imunológicos (ELISA-IgM, ELISA-IgG e/ou DTH) mostrando que estes indivíduos foram expostos ao parasita, o que gerou uma prevalência de infecção assintomática de 55,55%. Considerando todos os critérios utilizados para avaliar a infecção humana na região estudada, observamos que dos 576 indivíduos analisados, 424 mostraram-se positivos pelo diagnóstico clínico e parasitológico e/ou imunológico (ELISA/DTH) levando a uma prevalência geral de 73,61% da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi*. O número e a frequência de positividade para cada um dos testes imunológicos (ELISA e DTH) e a combinação entre eles para o grupo de indivíduos sintomáticos e assintomáticos pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5. Reatividade ao teste de hipersensibilidade tardia (DTH) para antígeno específico e teste de ELISA para IgG e IgM em indivíduos residentes em área endêmica de transmissão de *L. (L.) infantum chagasi*, município de Amapala, Honduras, 2017.

	Assintomáticos	Sintomáticos (LCNU)	População Total
	n (%)	n (%)	n (%)
IgG+/IgM+/DTH+	18 (3,8)	2 (1,9)	20 (3,5)
IgG+/IgM-/DTH+	28 (5,9)	4 (3,8)	32 (5,5)
IgG-/IgM+/DTH+	41 (8,7)	20 (19,2)	61 (10,6)
IgG-/IgM-/DTH+	66 (14,0)	32 (30,8)	98 (17,0)
IgG+/IgM+/DTH-	26 (5,5)	2 (1,9)	28 (4,9)
IgG+/IgM-/DTH-	33 (7,0)	2 (1,9)	35 (6,1)
IgG-/IgM+/DTH-	108 (22,9)	16 (15,4)	124 (21,5)
IgG-/IgM-/DTH-	152 (32,2)	26 (25,0)	178 (30,9)
Total/grupo	472 (100)	104 (100)	576 (100)

Importante salientar que, a resposta imunológica predominante no grupo de indivíduos sintomáticos, com a forma cutânea atípica (LCNU), foi a resposta de hipersensibilidade tardia, uma vez que 55,8% dos sintomáticos apresentaram o teste positivo e apenas 32,4% dos indivíduos assintomáticos apresentaram positividade neste teste. Já, nos indivíduos assintomáticos, a resposta imunológica predominante foi a humoral, onde 53,8% dos indivíduos apresentaram o teste de ELISA positivo, quer seja para IgG ou IgM, enquanto o grupo sintomático mostrou positividade para o teste de ELISA em 44,2% dos pacientes (Figura 11).

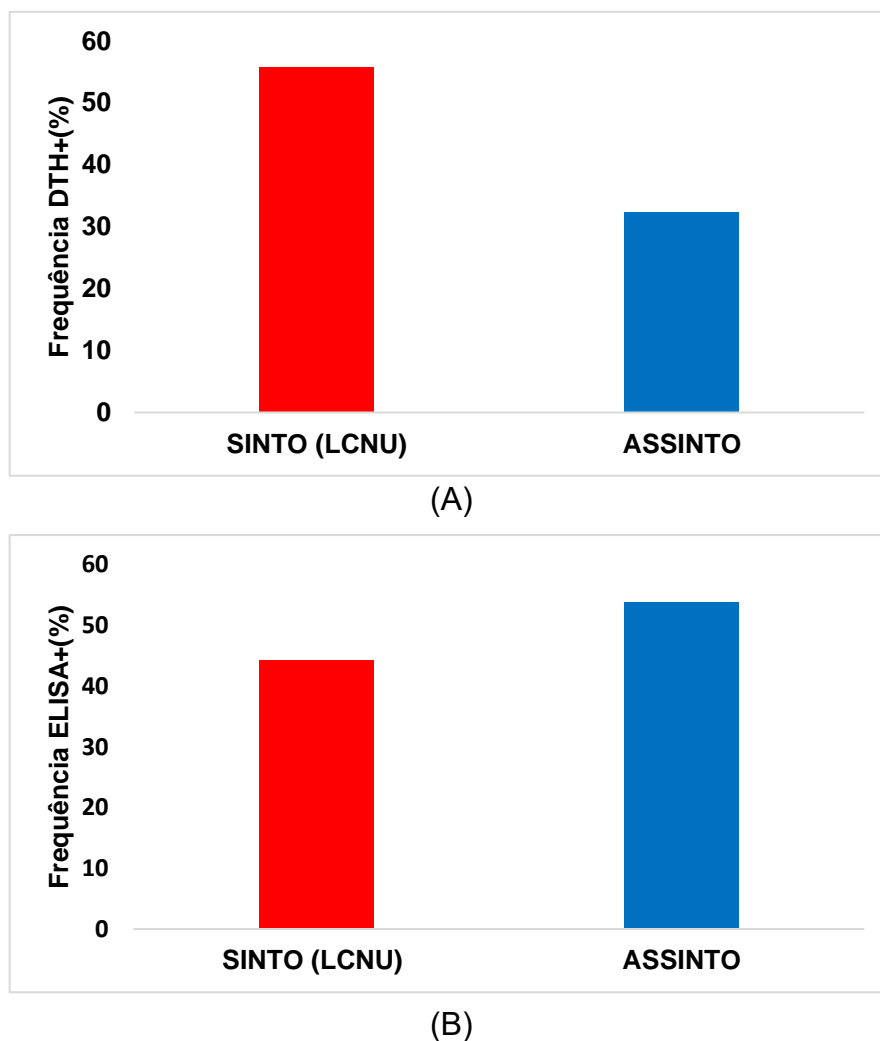


Figura 11: Frequência de positividade para o teste de hipersensibilidade tardia (DTH) ou teste de Montenegro (A) e para a reação de ELISA (B) em indivíduos sintomáticos (LCNU) e assintomáticos arrolados neste estudo. Município de Amapala, Honduras, 2017.

Baseado em estudos prévios do grupo (CRESCENTE *et al.*, 2009; SILVEIRA, *et al.*, 2010a) e nos achados clínicos e laboratoriais obtidos neste trabalho, principalmente nos testes que avaliam a imunidade humoral e celular frente ao antígeno específico, pudemos caracterizar sete perfis clínico imunológicos da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* na localidade de Amapala, região sul de Honduras, quatro na forma clínica sintomática (LCNU) e três na infecção assintomática. Dentre os indivíduos assintomáticos ($n = 472$), 320 foram identificados

com reatividade para um, ou outro, ou ambos os testes imunológicos (DTH/ELISA-IgG/ELISA-IgM). Os indivíduos que apresentaram somente resposta imune humoral positiva e resposta imune celular negativa (IgG+/IgM+/DTH-, IgG+/IgM-/DTH-, IgG-/IgM+/DTH-) foram caracterizados como Infecção Assintomática Indeterminada (**IAI**), 35,4% do total dos indivíduos assintomáticos; indivíduos que apresentaram resposta imune humoral e celular positivas (IgG+/IgM+/DTH+, IgG+/IgM-/DTH+, IgG-/IgM+/DTH+) foram caracterizados como Infecção Assintomática Resistente (**IAR**), 18,4% dos assintomáticos; os indivíduos que apresentaram apenas o teste de imunidade celular positiva (IgG-/IgM-/DTH+) foram caracterizados como Infecção Assintomática Final (**IAF**), 14% dos assintomáticos; e os indivíduos que se mostraram negativos para todos os testes (IgG-/IgM-/DTH-) foram considerados não expostos a infecção por *L. (L.) infantum chagasi*, 32,2% do grupo assintomático (Figura 12).

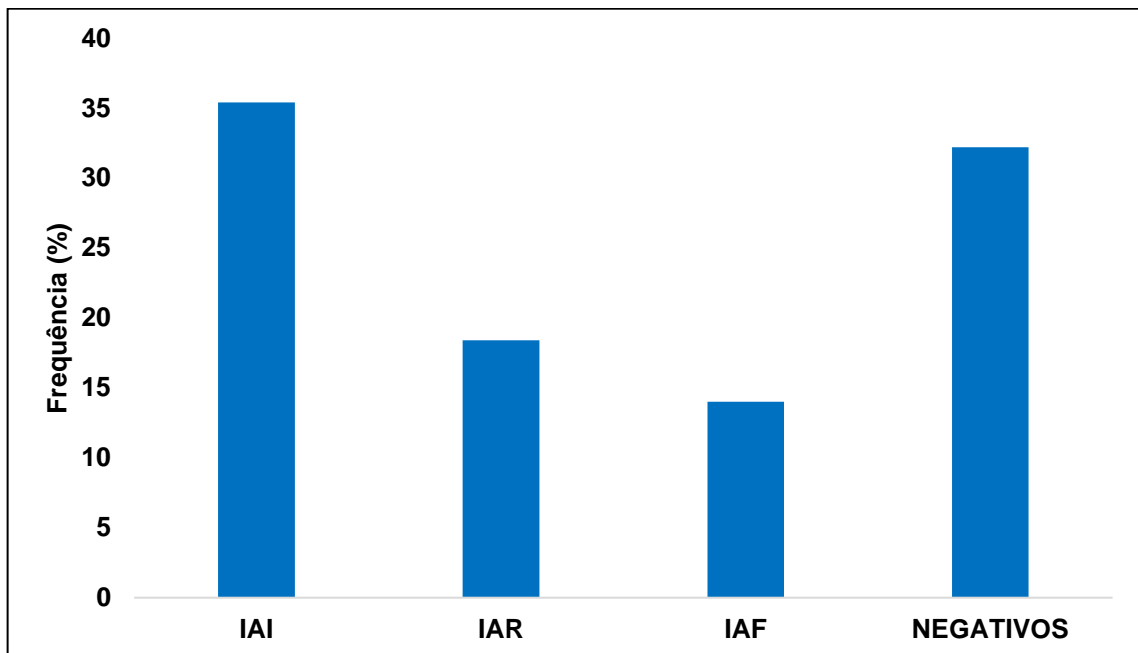


Figura 12: Distribuição de frequência dos perfis clínico-imunológico da infecção humana assintomática por *L. (L.) infantum chagasi*, no município de Amapala, Valle, Honduras. IAI: Infecção Assintomática Indeterminada; IAR: Infecção Assintomática Resistente; IAF: Infecção Assintomática Final.

Dentre os indivíduos acometidos pela LCNU (n = 104), ou seja, infecção sintomática com diagnóstico parasitológico positivo, foi possível identificar quatro perfis clínico-imunológicos da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* na área de estudo, baseado nos achados clínicos e laboratoriais obtidos nos testes que avaliam a imunidade humoral e celular frente ao antígeno específico. Deste modo, pacientes com LCNU que apresentavam resposta imune humoral positiva e resposta imune celular negativa (IgG+/IgM+/DTH-, IgG+/IgM-/DTH-, IgG-/IgM+/DTH-) foram caracterizados como Infecção Sintomática Indeterminada (**ISI**), 19,2% dos indivíduos sintomáticos; pacientes com LCNU que apresentavam os testes de imunidade humoral e celular positivos (IgG+/IgM+/DTH+, IgG+/IgM-/DTH+, IgG-/IgM+/DTH+) foram caracterizados como Infecção Sintomática Resistente (**ISR**), 25% dos indivíduos sintomáticos; pacientes com LCNU que apresentavam somente o teste de imunidade celular positivo (IgG-/IgM-/DTH+) foram caracterizados como Infecção Sintomática Final (**ISF**), 30,8% dos sintomáticos; e pacientes com LCNU que apresentavam todos os testes imunológicos negativos (IgM-/IgG-/DTH-) foram caracterizados como Infecção Sintomática Precoce (**ISP**), 25% dos sintomáticos (Figura 13).

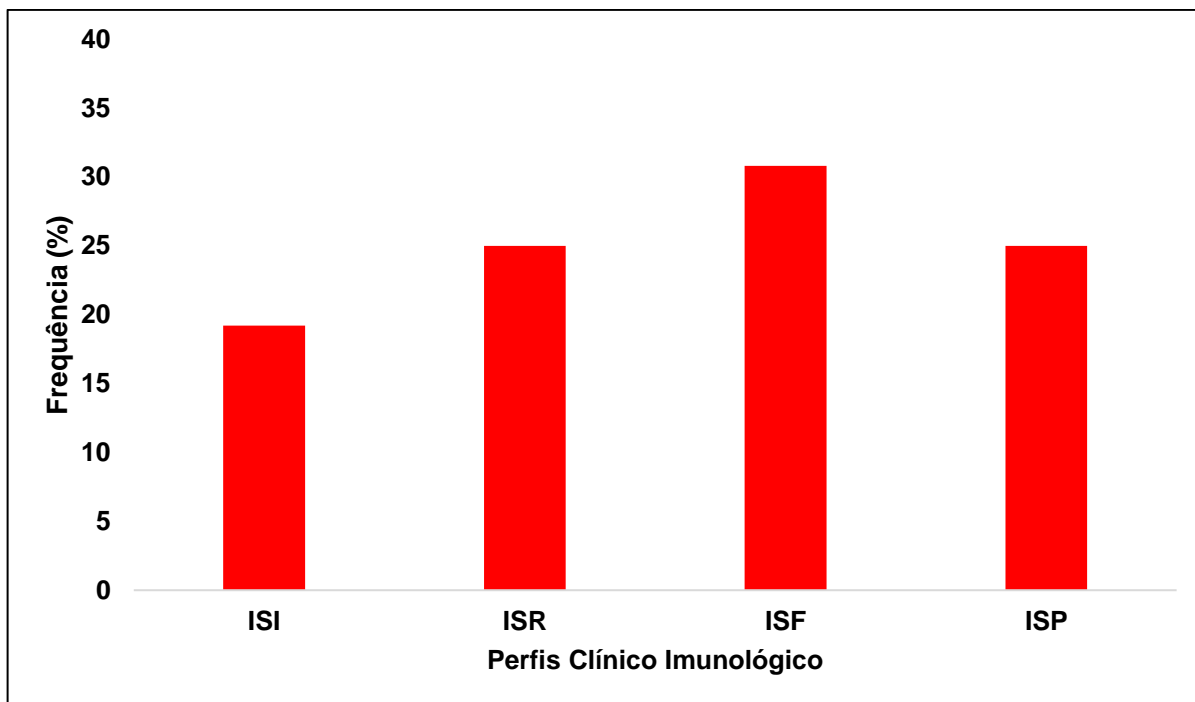


Figura 13: Distribuição da frequência dos perfis clínico-imunológico da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* nos indivíduos acometidos por leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU), no município de Amapala, Valle, Honduras. ISI: Infecção Sintomática Indeterminada; ISR: Infecção Sintomática Resistente; ISF: Infecção Sintomática Final; ISP: Infecção Sintomática Precoce.

Importante salientar que, nenhum dos indivíduos residentes na Ilha do Tigre, município de Amapala, Valle, Honduras, acompanhados neste estudo, apresentou qualquer sinal clínico compatível com leishmaniose visceral durante o período de desenvolvimento do projeto.

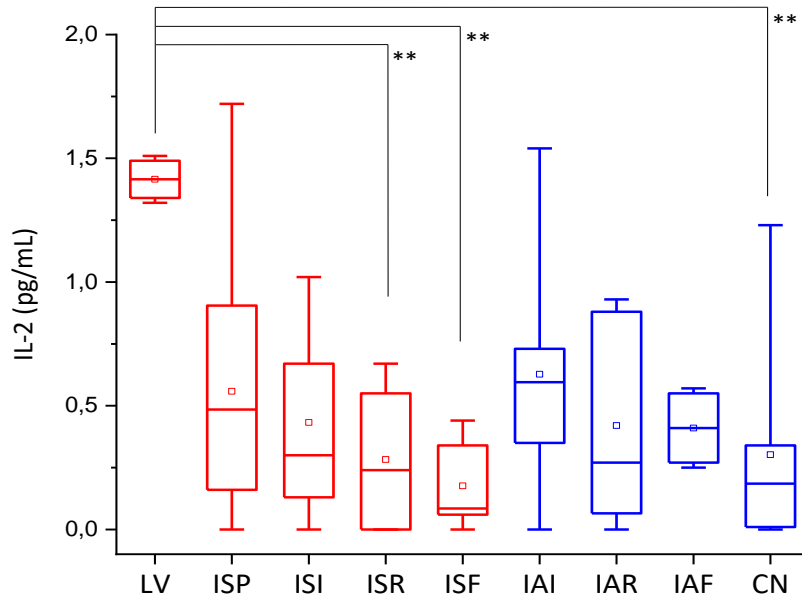
5.5 Determinação do perfil de citocinas no espectro clínico-imunológico da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* em Amapala, Honduras

Soros de indivíduos dos diferentes perfis clínico-imunológicos da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* foram ensaiados para determinação do perfil de citocinas. Os resultados para cada citocina foram comparados entre os diferentes

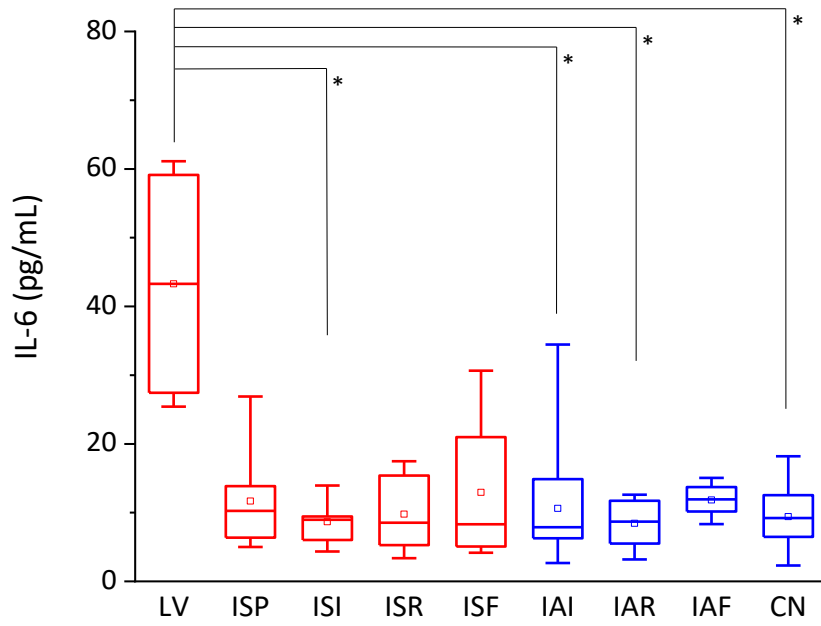
perfis da infecção encontradas neste estudo, além da infecção sintomática visceral e controles negativos, que são soros de indivíduos da mesma área de estudo que mostraram diagnóstico negativo para todos os exames clínicos e laboratoriais.

Entre as citocinas inflamatórias, IL-2 mostrou níveis mais elevados na infecção sintomática visceral (LV) quando comparado a ISR e ISF, e o grupo controle negativo ($p = 0,0015$) (Figura 14A); IL-6 mostrou níveis mais elevados nos soros de pacientes com LV em relação a ISI, IAI, IAR e controle negativo ($p = 0,05$) (Figura 14B); e IFN- γ mostrou níveis maiores nos soros dos pacientes com LV comparados aos soros dos grupos ISR ($p = 0,05$), ISF ($p = 0,05$) e IAR ($p = 0,001$) (Figura 14C). Em relação ao TNF- α , observamos níveis mais baixos na IAF em relação a ISP ($p = 0,0015$), IAI ($p = 0,05$) e soros controle negativos ($p = 0,0001$) (Figura 14D). Já, os níveis de IL-17 não mostraram diferenças entre os diferentes perfis clínicos da infecção e os controles (Figura 14E).

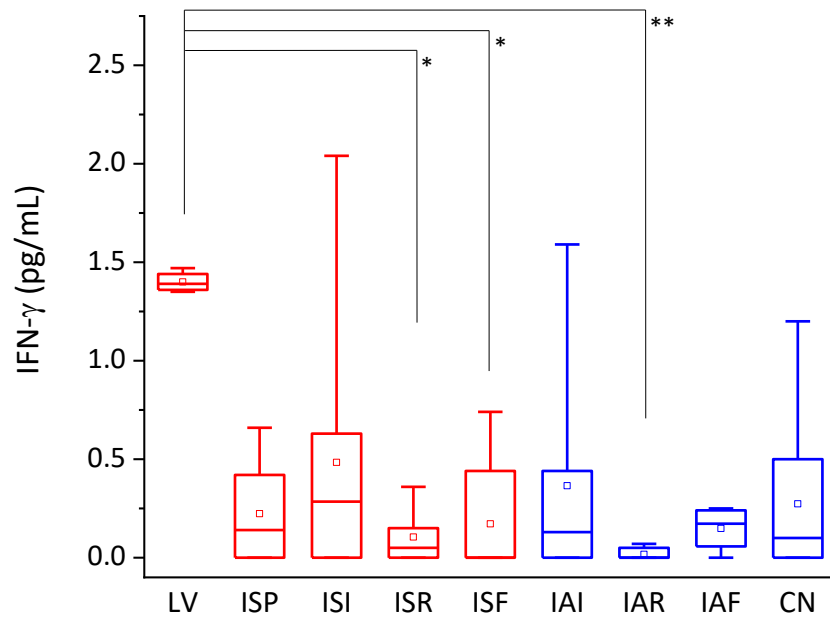
Em relação as citocinas anti-inflamatórias, os níveis séricos de IL-4 foram maiores na IAF quando comparada a ISR ($p = 0,0306$) (Figura 14F). Em relação as concentrações de IL-10, os níveis séricos nos soros de pacientes com LV mostraram-se mais elevados que na ISP, ISI ($p = 0,05$), IAR, IAF ($p = 0,0071$) e nos soros do grupo controle negativos ($p = 0,05$) (Figura 14G).



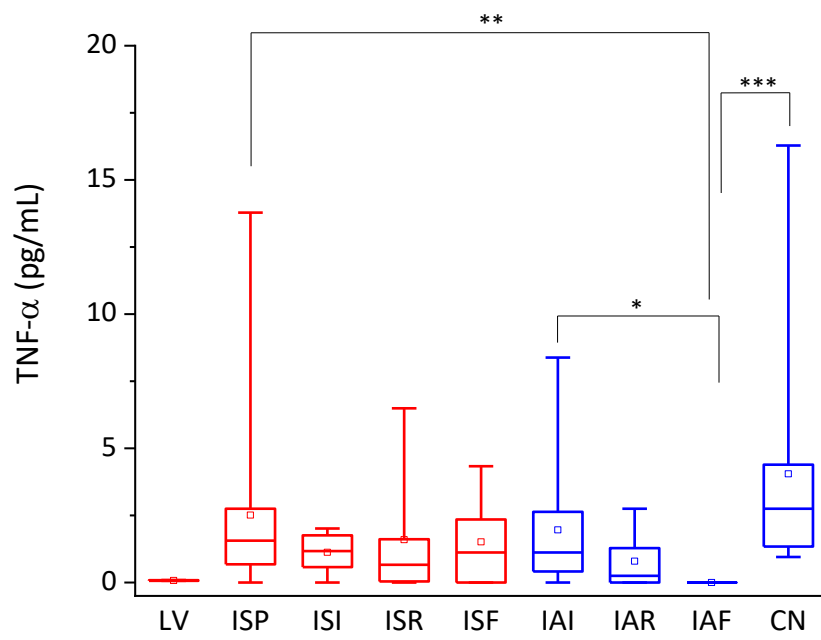
(A)



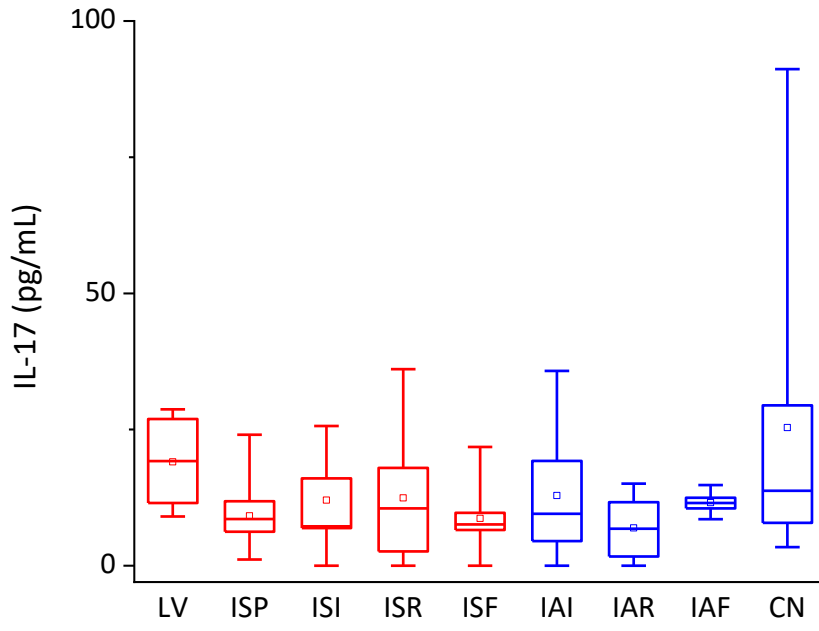
(B)



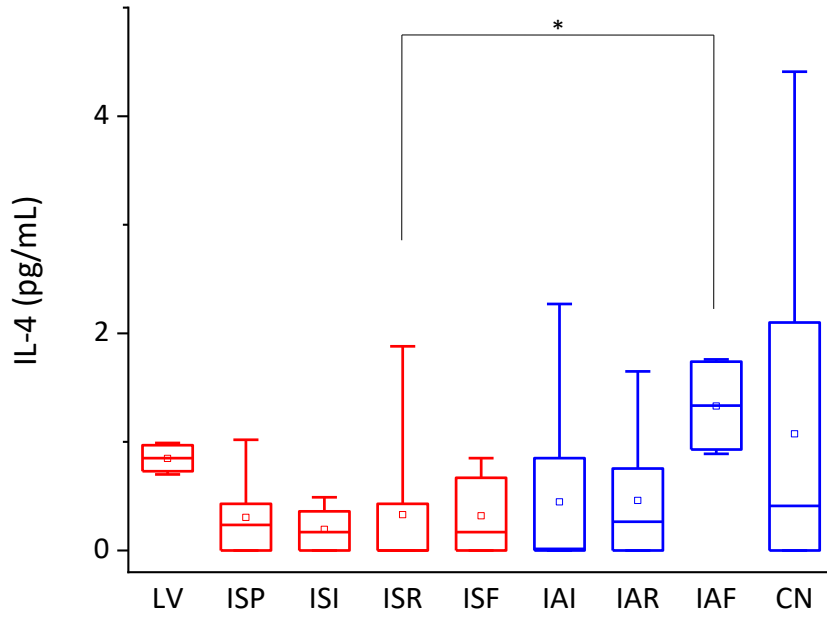
(C)



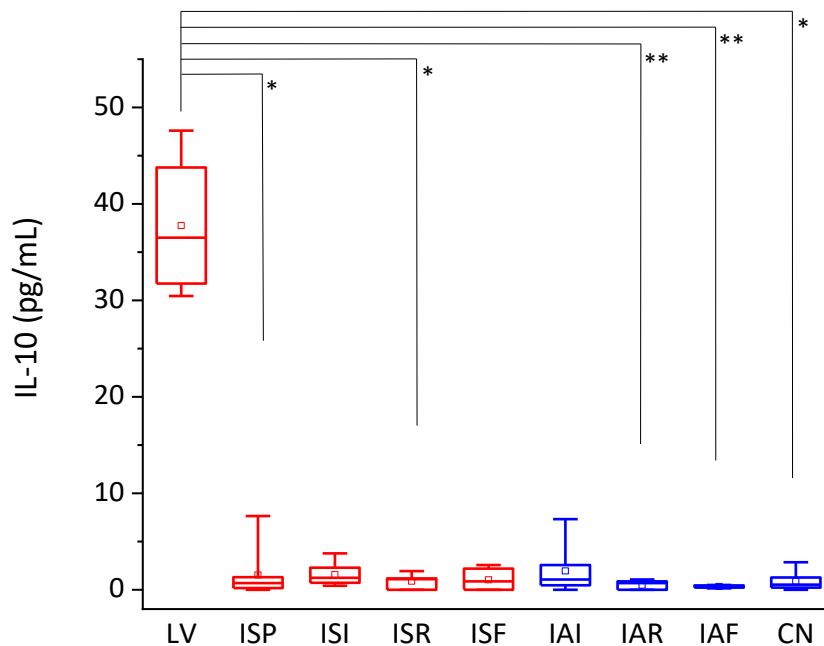
(D)



(E)



(F)



(G)

Figura 14: Gráficos em box plot mostrando a média, mediana, valores máximos e mínimos, e intervalos de confiança das concentrações séricas de IL-2 (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D), IL17A (E), IL-4 (F) e IL10 (G) no perfil clínico-imunológico da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* e os controles normal (CN) e infecção visceral (LV). Município de Amapala, Honduras, 2017. * $p < 0.05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

5.6 Determinação de subclasses de imunoglobulinas, IgG1 e IgG2

Foram analisadas um total de 142 amostras distribuídas entre os diferentes perfis clínico-imunológicos da infecção caracterizados pela resposta humoral, ELISA positiva para IgG total, sendo: IAI, IAR, ISI e ISR. Soros de indivíduos acometidos por LV foram empregados como controle positivo e soros de indivíduos da área endêmica sem sinal clínico de LV ou LCNU e com todos os testes imunológicos negativos foram utilizados para estabelecer o *cut-off* da reação.

Entre os soros de indivíduos com a infecção assintomática, 40,23% do perfil IAI e 46,94% do perfil IAR mostraram-se positivos para IgG1. Em relação a IgG2, somente

13,79% do perfil IAI e 14,29% do perfil IAR mostraram resultados positivos. Importante salientar que, 10,34% dos soros do perfil IAI e 12,24% dos soros do perfil IAR apresentaram níveis detectáveis de IgG1 e IgG2, simultaneamente. Todos os soros do grupo sintomático, tanto do perfil ISI como ISR, foram negativos para IgG1 e IgG2. Os soros de pacientes com LV mostram altos títulos de IgG1 e foram todos negativos para IgG2.

As densidades óticas obtidas para IgG1 e IgG2 nos diferentes perfis da infecção estão apresentadas na Figura 15 A e B. Observamos que os soros dos perfis IAI ($p=0,0003$), IAR ($p=0,001$) e ISR ($p=0,0003$) mostraram níveis mais baixos de IgG1 quando comparados aos soros de pacientes com LV. Já os níveis de IgG2 não mostram diferenças entre os diferentes perfis clínico-imunológicos da infecção.

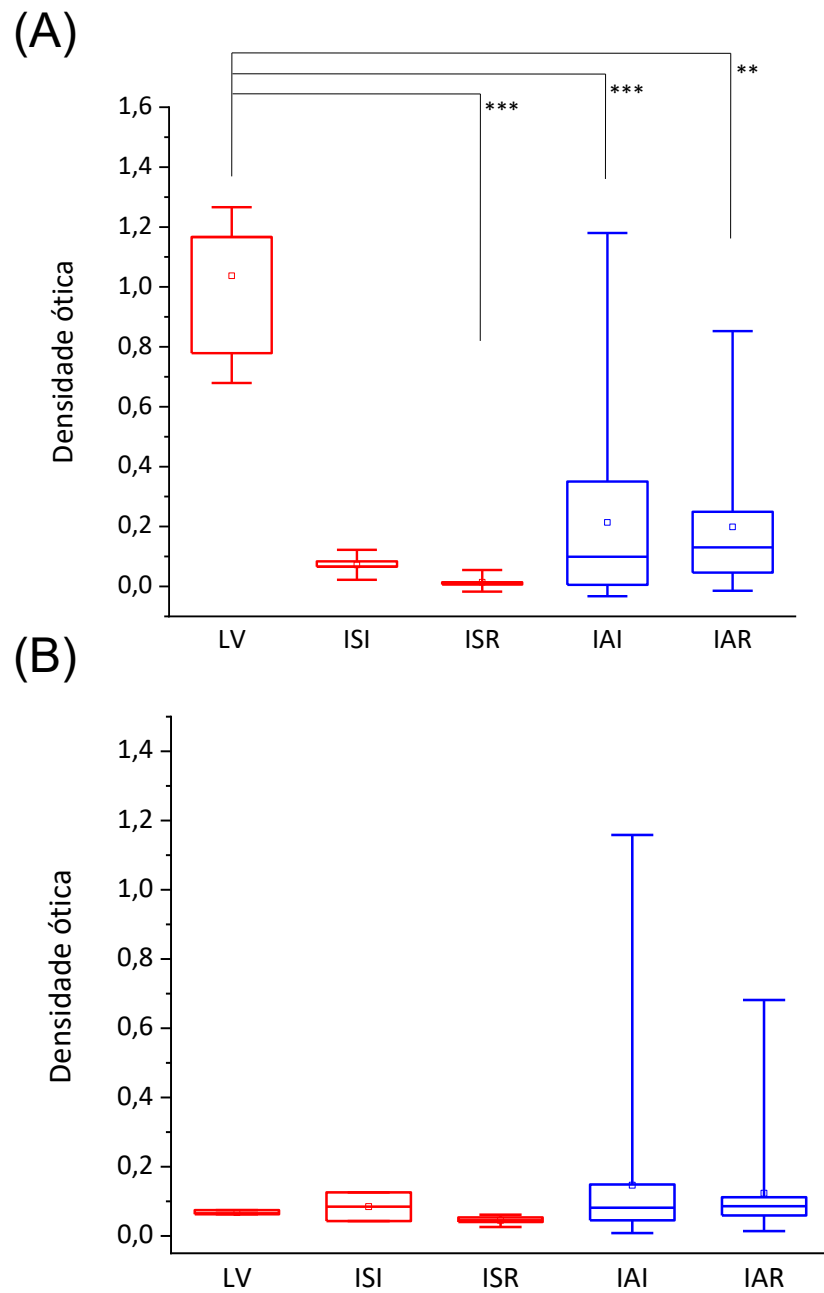


Figura 15: Gráficos em *box-plot* mostrando a média, mediana, valores máximos e mínimos, e intervalos de confiança das densidades óticas de IgG1 (A) e IgG2 (B) obtidas pelo teste de ELISA em soros de indivíduos pertencentes aos diferentes perfis clínico-imunológico da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi*. Município de Amapala, Honduras, 2017. ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

5.7 Distribuição de perfis clínico-imunológicos da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* no estudo de incidência

No estudo da primeira incidência, aos 12 meses após a determinação a prevalência da infecção, a incidência nos indivíduos assintomáticos foi de 74,8% (131 casos novos para 175 indivíduos não infectados); 94 casos (71,8%) associados ao IAF, 23 casos (17,6%) ao IAI e 14 (10,7%) ao perfil IAR. Já no estudo da segunda incidência, aos 24 meses após a determinação da prevalência da infecção na área de estudo, a incidência foi de 73,3% (44 casos novos para 60 indivíduos não infectados); 33 casos (75%) associados ao perfil IAF, 2 casos (4,5%) associados ao perfil IAI e 9 casos (20,5%) ao perfil IAR. Nenhum caso dos indivíduos infectados e/ou expostos, desenvolveu lesões cutâneas suspeitas de LCNU (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição dos perfis clínico-imunológicos da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* na prevalência e incidências em indivíduos assintomáticos.

Estudo	Perfis clínico-Imunológico [n (%)]		
	IAF	IAI	IAR
Prevalência (n=319 cases)	66 (22.6)	167 (33.0)	86 (44.3)
Incidência 1	94 (71.8)	23 (17.6)	14 (10.7)
Incidência 2	33 (75)	2 (4.5)	9 (20.5)
Incidência Final (n= 175 cases)	127 (72.6)	25 (14.3)	23(13.1)
Prevalência Acumulada (n= 494)	193 (39.1)	192 (38.9)	109 (22.1)
Evolução Final (n=494)	213 (43.0)	164 (33.0)	117 (24.0)

IAF: Infecção Assintomática Final; IAI: Infecção Assintomática Indeterminada; IAR: Infecção Assintomática Resistente

No estudo da primeira incidência, aos 12 meses após a determinação da prevalência, observamos 37 dos 39 casos de infecção sintomática precoce (ISP), aqueles indivíduos que apresentavam lesão de pele, porém, eram negativos para

ambas as provas imunológicas, converteram para um ou outro teste imunológico, apresentando portanto DTH+, ELISA+ ou ambos testes, o que gerou uma incidência de 94,8%; sendo 15 casos (40,5%) associados ao perfil de ISF, 9 (24,3%) ao perfil ISR, 2 (5,4%) ao perfil ISI, e 11 (29,7%) permaneceram no perfil de ISP. Na segunda incidência, aos 24 meses após a prevalência, todos os indivíduos converteram a algum dos testes imunológicos (ELISA-IgG, ELISA-IgM ou DTH) (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição dos perfis clínico-imunológicos da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* na prevalência e incidência em pacientes sintomáticos.

Estudo	Perfis Clínico-Imunológico [n (%)]			
	ISI	ISR	ISF	ISP
Prevalência (n=104 cases)	20 (19.2)	26 (25.0)	32 (30.8)	26 (25.0)
Incidência 1	2 (5.4)	9 (24.3)	15 (40.5)	11 (29.7)
Incidência 2	1 (5.6)	5 (27.8)	11 (61.1)	1 (5.6) *
Incidência Final (n= 55 cases)	3 (5.5)	14 (25.5)	26 (47.3)	12 (21.8)
Prevalência Acumulada (n= 159)	23 (14.5)	40 (25.2)	58 (36.5)	38 (23.9)
Evolução Final (n=159)	26 (16.3)	42 (26.4)	68 (43.0)	23 (14.3)

ISI: infecção sintomática indeterminada; ISR: infecção sintomática resistente; ISF: infecção sintomática final; ISP: infecção sintomática precoce

*Paciente entrou na Incidência 2.

5.8 Distribuição por idade dos perfis clínico-imunológicos da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* nos estudos de prevalência e incidência.

A distribuição dos indivíduos assintomáticos na prevalência por idade mostrou uma maior frequência nos diferentes perfis de infecção nos indivíduos > 21 anos, principalmente no perfil IAI. Porém, na incidência o grupo que apresentou maior frequência foi o IAF (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição por idade dos perfis clínico-imunológico da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* em indivíduos assintomáticos nos estudos de prevalência e incidência no município de Amapala, Valle, Honduras

Grupo Idade (anos)	n (%)	Perfis clínico-Imunológico [n (%)]		
		IAF	IAI	IAR
Prevalência (n=319 casos)				
1-10	27 (8,5)	3 (11,1)	15 (55,6)	9 (33,3)
11-20	97 (30,4)	10 (10,3)	64 (66,0)	23 (23,7)
≥21	195 (61,1)	53 (27,2)	88 (45,1)	54 (27,7)
Incidência (n= 175 casos)				
1-10	14 (8.0)	10 (71,4)	3 (21,4)	1 (7,1)
11-20	57 (32,6)	36 (63,2)	11 (19,3)	10 (17,5)
≥21	104 (59,4)	81 (77,9)	11 (10,6)	12 (11,5)

IAF: infecção assintomática final; IAI: infecção assintomática indeterminada; IAR: Infecção Assintomática Resistente

Com respeito aos pacientes sintomáticos, a distribuição dos diferentes perfis clínico-imunológicos da infecção por idade na prevalência e incidência mostrou uma maior frequência na faixa etária entre 11-20 anos de idade, principalmente no perfil ISF (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição por idade dos perfis clínico -imunológico da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* em pacientes sintomáticos nos estudos de prevalência e incidência no município de Amapala, Valle, Honduras

Grupo Idade (anos)	n (%)	Perfis clínico-Imunológico [n (%)]			
		ISI	ISR	ISF	ISP
Prevalência (n=104 casos)					
1-10	21	4 (19.0)	7 (33.3)	5 (23.8)	5 (23.8)
11-20	44	10 (22.7)	14 (31.8)	13 (29.5)	7 (15.9)
≥21	39	6 (15.4)	5 (12.8)	14 (35.9)	14 (35.9)
Incidência (n= 55 casos)					
1-10	8	1 (12.5)	3 (37.5)	4 (50.0)	-
11-20	27	1 (3.7)	7 (25.9)	13 (48.1)	6 (22.2)
≥21	20	1 (5.0)	4 (20.0)	9 (45.0)	6 (30.0)

ISI: infecção sintomática indeterminada; ISR: infecção sintomática resistente; ISF: infecção sintomática final; ISP: infecção sintomática precoce

5.9 Dinâmica da evolução clínica e imunológica da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* no município de Amapala, Valle, Honduras.

O acompanhamento da coorte por dois anos, nos permitiu avaliar a evolução da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* no município de Amapala, Honduras e propor um diagrama de evolução clínico-imunológica à infecção (Figura 16 e Figura 17). Desta forma, dos indivíduos assintomáticos e negativos para as provas imunológicas de imunidade humoral (ELISA) e imunidade celular (DTH), portanto, não exposto à infecção por *Leishmania*, 26,4% dos indivíduos converteram para o perfil IAI (ELISA+), 24% para o perfil IAF (DTH+) e 3,7% para o perfil de IAR (ELISA+/DTH+). Os indivíduos que estavam no perfil de IAI na prevalência, 26,2 % converteram sua prova de hipersensibilidade tardia até o final do estudo, 24 meses, evoluindo para o perfil IAR (ELISA+/DTH+) e 17,1% converteram para o perfil IAF (DTH+). Com respeito aos indivíduos do perfil IAR, a maioria negativou os testes sorológicos com a evolução da infecção caminhando para o perfil de IAF. Importante salientar que, nenhum caso de IAF, quer seja determinado na prevalência ou que evoluiu para este perfil durante a primeira incidência, evoluiu para a forma sintomática da infecção desenvolvendo lesões cutâneas sugestivas de LCNU.

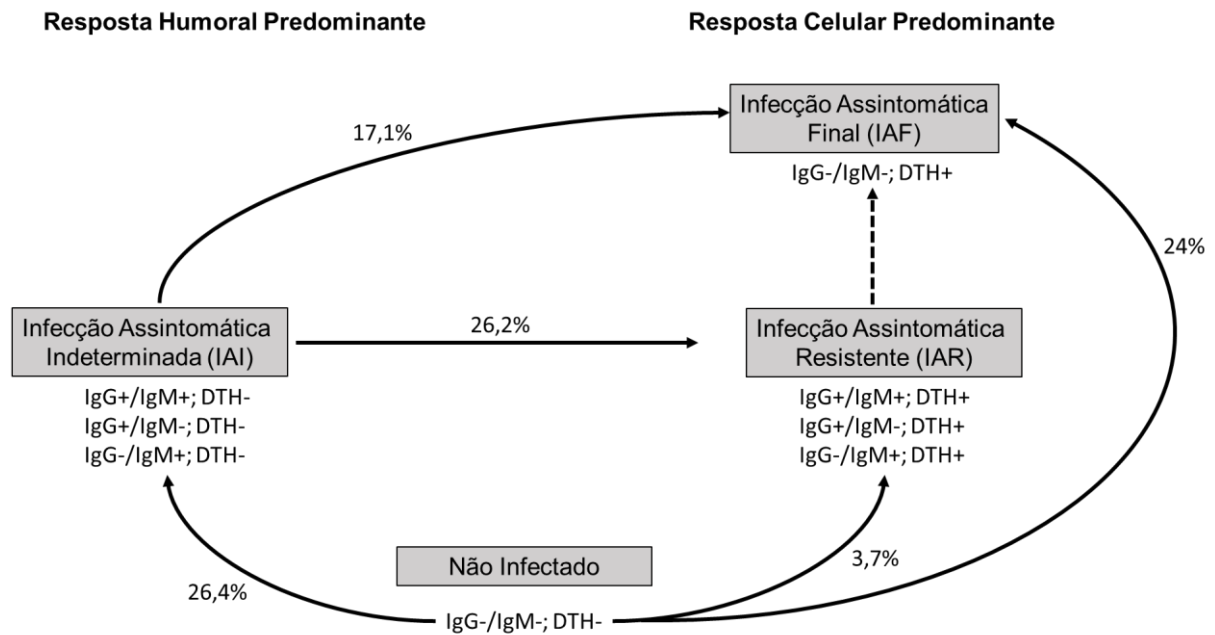


Figura 16: Proposta de dinâmica da evolução clínica e imunológica dos pacientes assintomáticos da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* em Honduras, América Central. IAI: infecção assintomática indeterminada; IAR: infecção assintomática resistente; IAF: infecção assintomática final

O perfil ISF foi o mais frequente nos pacientes sintomáticos (LCNU), é um perfil caracterizado por ter uma resposta celular forte e sem resposta humoral, sendo que na prevalência, 30,8% dos casos mostraram-se neste perfil. Em relação ao perfil ISP, indivíduos com lesão cutânea, diagnóstico parasitológico positivo com os testes imunológicos negativos, portanto, caracterizado como infecção precoce, 59% deles converteu a prova de imunidade celular (DTH+) evoluindo para o perfil ISF, 18% converteu ambas as provas imunológicas (ELISA+/DTH+) evoluindo para o perfil ISR e outros 18% converteram somente a imunidade humoral (ELISA+) evoluindo para ISI. Em relação ao perfil ISI (ELISA+), 10% dos pacientes converteram a prova de imunidade celular (ELISA+/DTH+) evoluindo para o perfil ISR e 25% dos pacientes converteram a prova de imunidade celular e negativaram a prova de imunidade humoral (ELISA-/DTH+) caminhando para o perfil ISF. E, finalmente, a grande maioria dos indivíduos no perfil ISR evoluiu para ISF revertendo a prova de imunidade humoral

mantendo definitivamente, a resposta de imune celular ativada. Importante salientar que durante o período deste estudo, nenhum dos pacientes com LCNU desenvolveu a forma visceral da doença.

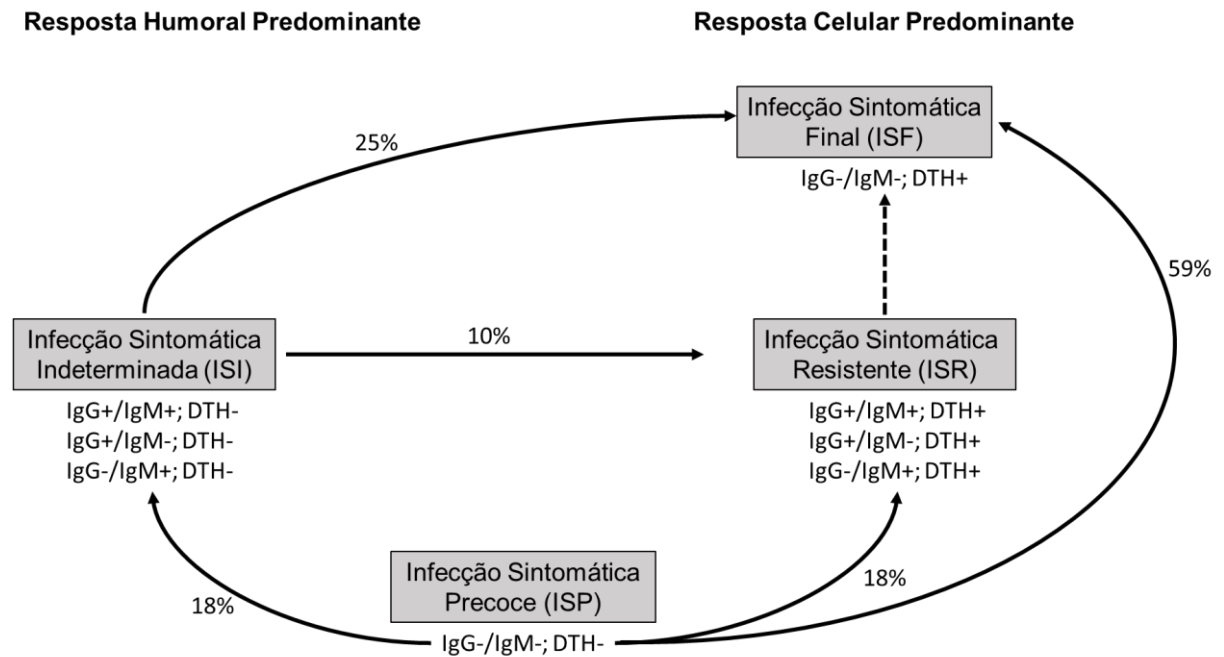


Figura 17: Proposta de dinâmica da evolução clínica e imunológica dos pacientes sintomáticos da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* em Honduras, América Central. ESI: infecção sintomática inicial; ISI: infecção sintomática indeterminada; RSI: infecção sintomática resistente; FSI: infecção sintomática final

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como propósito, caracterizar o espectro clínico-imunológico da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* no município de Amapala, Honduras, área endêmica de leishmaniose visceral e, principalmente, leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica. Vale destacar que, este é o primeiro estudo sobre perfis clínico-imunológicos do espectro da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* na Mesoamérica. Foi empregado, além do exame clínico dos indivíduos arrolados neste estudo, o exame parasitológico, através de raspado das lesões cutâneas, bem como testes para avaliar a resposta imune humoral (ELISA) e celular (teste intradérmico de Montenegro ou DTH). Esses parâmetros foram empregados, não só para o diagnóstico, como também para compreender a dinâmica da evolução clínica e imunológica da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* em Honduras.

O município de Amapala tem várias características epidemiológicas que permitem a transmissão da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* (CARRASCO *et al.*, 1998; PONCE *et al.*, 1991); como, por exemplo, a presença de vetores como *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) e *Lutzomyia evansi* (Nuñez-Tovar, 1924), as duas espécies de flebotomíneos, mais prevalentes na região do estudo, são também as duas espécies mais abundantes nas florestas tropicais ao redor da área de estudo (MEJIA *et al.*, 2018). Essas condições de alta prevalência e abundância da fauna flebotomínea, é um parâmetro importante para o conhecimento do padrão da infecção por *L. (L.) infantum chagasi* na região do estudo, uma vez que foi sugerido que uma grande exposição por longo tempo pode favorecer o desenvolvimento de imunidade de rebanho, conforme relatado na região nordeste do

Brasil (CRESCENTE *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2010a). Foi também demonstrado que a resistência à LV pode ser controlada por mecanismo genético relacionado com a capacidade do hospedeiro de montar uma resposta imune adquirida eficaz contra a infecção por *L. (L.) infantum chagasi*, medida pelo fenótipo de DTH+ associado aos genes LECT2 e TGFBI (JERONIMO; DUGGAL, *et al.*, 2007; JERONIMO; HOLST, *et al.*, 2007). Estudos anteriores relataram características semelhantes em pacientes LCNU em Honduras (PONCE *et al.*, 1991) e Nicarágua (BELLI *et al.*, 1999), descrevendo o teste de Montenegro (DTH) positivo como o achado mais relevante, 58% e 79%, respectivamente. Achados semelhantes são relatados no presente estudo que mostrou reação DTH positiva em ambos os perfis clínico-imunológicos resistentes, sintomáticos (RSI e FSI) e assintomáticos (RAI e FAI), com taxas de 55,7% e 32,4%.

Na primeira parte do presente estudo, foi realizada uma caracterização epidemiológica dos indivíduos arrolados na coorte. Trabalhamos com uma população de 576 indivíduos, dos quais 104 apresentavam lesão cutânea não ulcerada com confirmação de diagnóstico parasitológico em 100%; e o restante, 472 indivíduos eram assintomáticos. Em relação à distribuição por gênero da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* (LCNU), nenhuma diferença significativa foi encontrada quanto ao sexo ($P > 0,82$), conforme relatado em estudos anteriores (CRESCENTE *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2005; PONCE *et al.*, 1991); no entanto, a infecção foi mais frequente nas faixas etárias maiores. As lesões macroscópicas eram em sua maioria únicas, pequenas (< 5 mm), nodulares e não ulceradas com um halo hipopigmentado como descrito anteriormente (BELLI *et al.*, 1999; PONCE *et al.*, 1991; ZELEDON *et al.*, 1982). Quanto à localização, as lesões cutâneas ocorreram, principalmente, nas

extremidades do corpo como membros superiores e inferiores, seguidas do tórax, com tempo de evolução inferior a 12 meses.

Em relação à prevalência de infecção cutânea humana na área de estudo, é importante salientar que, os critérios clínicos que definiram a leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica não devem ser negligenciados, haja visto que 100% dos casos suspeitos foram confirmados pelo encontro de formas amastigotas de *Leishmania* nos esfregaços de lesão cutânea corados pelo Giemsa, demonstrando a importância da experiência do observador durante o diagnóstico clínico da LCNU. Portanto, em um primeiro momento, estimou-se a prevalência de infecção considerando os casos sintomáticos (LCNU) que foram confirmados pelo exame parasitológico (n=104), gerando uma taxa de prevalência de 18%. Após a realização dos testes imunológicos para avaliar a exposição ao agente infeccioso, considerando os indivíduos assintomáticos, que foram avaliados através da sorologia para determinação de IgG e IgM específica, assim como, através da reação intradérmica de Montenegro (DTH), observamos 320 indivíduos positivos para um ou outro teste, o que levou uma prevalência de 55,5% neste grupo. Por fim, considerando-se o número de casos de sintomáticos (n=104), pacientes acometidos pela LCNU e os indivíduos assintomáticos que mostraram algum ou ambos os testes imunológicos positivos (n=320), portanto, considerados indivíduos expostos ao parasita, o estudo totalizou 424 infectados, doentes ou não, revelando uma prevalência geral de 73,6%.

Sem dúvida, isso reflete uma situação epidemiológica muito interessante, pelos seguintes motivos: primeiro, porque destaca a importância da suspeita clínica na avaliação da prevalência de infecção sintomática, uma vez que 100% dos casos suspeitos de LCNU foram confirmados pelo exame parasitológico; segundo, se uma projeção de LCNU for feita na população da ilha “Del Tigre” (~ 5.000 indivíduos) com

base na taxa de prevalência de infecção sintomática determinada (18%), é possível estimar a existência de aproximadamente 900 casos de LCNU na ilha, o que representam informações importantes para a Secretaria de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do Município de Amapala; e terceiro, embora a prevalência da infecção assintomática (55,5%) não revele uma estimativa da doença, esta determinação é de grande valia para melhor compreender a magnitude da situação epidemiológica da infecção na área de estudo, onde se observou uma taxa final de prevalência muito elevada de 73,6%, indicando que quase 75% da população na área de estudo está infectada por *L. (L.) infantum chagasi*. A importância dos testes utilizados, tanto a sorologia (imunidade humoral) com o teste de hipersensibilidade tardia (imunidade celular), como ferramenta de diagnóstico para a infecção humana por espécies viscerotrópicas de *Leishmania* foi, sem dúvida, amplamente demonstrada não apenas no Novo Mundo (BADARO *et al.*, 1986a; BADARO *et al.*, 1986b; BELLI *et al.*, 1999; JERONIMO; HOLST, *et al.*, 2007; JERONIMO *et al.*, 2000; PONCE *et al.*, 1991), mas também, no Velho Mundo (MORAL *et al.*, 2002; PAMPIGLIONE *et al.*, 1974; PAMPIGLIONE *et al.*, 1975). Porém, como mostram nossos dados apresentados na Tabela 5, a utilização de classes de imunoglobulinas no ensaio sorológico de ELISA (ELISA-IgM / IgG) não pode ser negligenciada como uma ferramenta importante também no diagnóstico de infecção, uma vez que, comparando as duas ferramentas diagnósticas (ELISA e DTH) no presente estudo, verificamos que no espectro da infecção assintomática, o diagnóstico sorológico (ELISA-IgM / IgG) confirmou 35,4% de indivíduos com o perfil de Infecção Assintomática Indeterminada (IAI), enquanto que o teste de Montenegro (DTH) confirmou os perfis de Infecção Assintomática Resistente (IAR) e Infecção Assintomática Final (IAF) em 32,4% dos indivíduos, mostrando que não houve

diferença entre a positividade por ELISA e DTH no grupo assintomáticos ($P > 0,05$) apontando que tanto a imunidade humoral quanto a celular parecem estar fortemente associadas no curso da infecção assintomática.

É interessante notar, porém, que, no espectro da infecção sintomática (LCNU), observou-se que o teste de hipersensibilidade tardia (DTH) positivo caracterizando os perfis de Infecção Sintomática Resistente (ISR) e Infecção Sintomática Final (ISF) totalizaram 55,7% desses casos, o que foi significativamente maior ($P < 0,05$) que os perfis de Infecção Sintomática Indeterminada (ISI) determinado pelo teste de ELISA IgG / IgM positiva, totalizando 19,2% dos casos de LCNU, sugerindo que, ao contrário do curso da infecção assintomática, a imunidade celular se sobrepôs à humoral, o que possivelmente pode estar correlacionado à forte resposta imune celular nas lesões que foram caracterizadas por uma resposta inflamatória mononuclear com a presença de granulomas e abundantes células $CD8^+$ com correlação direta positiva com células produtoras de $IFN-\gamma$ (SANDOVAL *et al.*, 2021; SANDOVAL PACHECO *et al.*, 2018; SANDOVAL PACHECO *et al.*, 2021). Além disso, estas lesões cutâneas mostram expressivo número de macrófagos $M1, NOS^+$ (SANDOVAL PACHECO *et al.*, 2021). Esses resultados parecem demonstrar, definitivamente, que a abordagem diagnóstica da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi*, bem como as respostas imunológicas dos indivíduos infectados em uma área endêmica, não devem ser feitas por apenas uma abordagem metodológica, quer seja avaliando a imunidade celular ou a imunidade humoral, considerando a magnitude do repertório da resposta imune na infecção humana. Nesse sentido, é importante ressaltar que a abordagem diagnóstica da infecção utilizada no presente estudo buscou contemplar os dois tipos de resposta imunológica da infecção, celular e humoral, na Amazônia brasileira (CRESCENTE *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2010a; SILVEIRA *et*

al., 2010b), que fornece uma maior visibilidade da resposta imune destes indivíduos com a identificação vários perfis de infecção; no nosso caso, de sete perfis clínico-imunológicos, três no espectro da infecção assintomática (Infecção Assintomática Indeterminada - IAI, Infecção Assintomática Resistente - RAI, e Infecção Assintomática Final- FAI), e quatro no espectro da infecção sintomática (LCNU) (Infecção Sintomática Precoce - ISP, Infecção Sintomática Indeterminada- ISI, Infecção Sintomática Resistente - ISR e Infecção Sintomática Final - ISF).

Quanto à importância desses perfis clínico-imunológicos da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* na área de estudo, definida pela associação do estado clínico dos indivíduos examinados (sintomáticos e assintomáticos), exame parasitológico e exames imunológicos (ELISA-IgM / IgG e DTH), vale ressaltar que, dentro do espectro da infecção sintomática (LCNU), chama a atenção, o perfil clínico-imunológico da Infecção Sintomática Precoce (ISP), devido ao seu quadro clínico confirmado por diagnóstico parasitológico, porém, sem detecção das respostas imunes humoral (ELISA-IgM / IgG) e celular (DTH). À primeira vista, trata-se de uma condição que parece representar um estado infeccioso inicial, razão pela qual foi denominada Infecção Sintomática Precoce (ISP); provavelmente, não por não ter havido tempo suficiente para que a carga parasitária nas lesões cutâneas desses pacientes desencadeasse um estímulo antigênico capaz de promover a ativação da resposta imune quer seja humoral ou celular. Nesse sentido, é importante dizer que, em alguns casos de LCNU observados no presente estudo, havia um número muito limitado de lesões cutâneas (uma ou duas), de aspecto papular (≤ 5 mm), e com baixa carga parasitária na microscopia, confirmando a baixa carga parasitária na pele observada na LCNU (SANDOVAL PACHECO *et al.*, 2018). De qualquer forma, é necessário enfatizar que esta é uma condição que parece inédita no estudo das

leishmanioses, uma vez que, até o momento, não se conhece outra situação clínico-imunológica relacionada à infecção por *Leishmania* sintomática humana, que não seja suportada por uma resposta imune humoral ou celular. Uma outra explicação para este fato incomum poderia ser decorrente de um mecanismo de escape do parasita às respostas imune humoral e/ou celular, já evidenciado na Amazônia brasileira, principalmente, no que se refere à leishmaniose tegumentar por *Leishmania (L.) amazonensis*, espécie do parasita que parece utilizar este mecanismo de escape da resposta imune celular para promover as formas clínicas graves como a leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB) e leishmaniose cutânea anérgica difusa, que estão associadas à importante imunossupressão celular, com resposta negativa de hipersensibilidade tardia e má resposta terapêutica para diferentes esquemas de tratamento (CAMPOS *et al.*, 2018; SILVEIRA, 2019; SILVEIRA, *et al.*, 2018).

Outro ponto que merece destaque em relação ao perfil da Infecção Sintomática Precoce (ISP) é a sua alta frequência (25%) entre os perfis de infecção sintomática, sendo superada, apenas, pela frequência (30,8%) do perfil da Infecção Sintomática Final (FSI), o que denota que, entre os perfis clínico-imunológicos da infecção sintomática (LCNU), o perfil ISP também pode sinalizar um estado de adaptação do parasita na pele do hospedeiro, buscando, possivelmente, produzir uma resposta imunoinflamatória de moderada intensidade, com o objetivo de utilizar o hospedeiro, apenas, como fonte de infecção do vetor flebotomíneo.

A presença ou ausência de lesões de LCNU típicas foi empregada em análise de regressão politômica como uma variável de resposta, *Odds ratios* foram estimados para diferentes combinações de resultados de teste e se observou que os coeficientes para o grupo DTH+ ($P < 0,002$) e IgM+/DTH+ ($P < 0,001$) foram os melhores preditores de lesão de LCNU (SOSA-OCHOA *et al.*, 2020b). Estes resultados ajudam a

estabelecer uma possível interação entre a exposição à infecção por *L. (L.) infantum chagasi*, o aparecimento de um marcador precoce (IgM) e um marcador de resistência (DTH) no desenvolvimento da proteção imunológica na infecção por *L. (L.) infantum chagasi* nos habitantes da zona do Pacífico de Honduras.

No sentido de aprofundar os conhecimentos em relação a imunidade celular na infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* no sul de Honduras, avaliamos o perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 por citometria de fluxo em algumas amostras de soro de indivíduos assintomáticos e pacientes acometidas por LCNU pertencentes aos diferentes perfis de infecção dentro espectro clínico-imunológico da infecção caracterizado neste estudo, que compreende: infecção assintomática IAI, IAR, IAF; e infecção sintomática ISI, ISR, ISP, ISF. Soros de indivíduos sadios, assim como soros de LV foram empregados como controles.

Tanto as citocinas pró-inflamatórias como as anti-inflamatórias não mostraram diferenças significativas entre os indivíduos infectados e o controle sadio, tanto para o grupo assintomático como para o grupo sintomático, com exceção do grupo IAF que mostrou concentração maior de que o controle sadio para TNF- α . Importante salientar que, apenas alguns casos dos grupos ISP, ISF e IAI mostraram concentração acima de 20 pg/mL, limite de detecção do kit, para IL-6. O mesmo ocorreu com os grupos ISP, ISI, ISR, ISF e IAI para IL-17A. Estes resultados mostram que os indivíduos infectados por *L. (L.) infantum chagasi* em Amapala, quer apresentem a infecção sintomática ou assintomática, tem uma fraca resposta imune celular sistêmica, embora grande parte destes indivíduos, 55,8% no grupo sintomático e 32,4% no grupo assintomático, apresentem reação intradérmica de Montenegro positiva. Por outro lado, na leishmaniose visceral, ocorre um aumento na produção de múltiplas citocinas, pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, responsáveis pela manutenção de um processo

inflamatório sistêmico que permite a manutenção e a replicação parasitária, semelhante ao que já foi descrito na literatura (DOS SANTOS *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2016).

Em relação à imunidade humoral, 44,2% dos pacientes acometidos por LCNU apresentaram reação de ELISA positiva para IgG, enquanto 53,8% dos indivíduos assintomáticos mostraram reação positiva para IgG, mostrando uma resposta de anticorpos mais acentuada no grupo assintomático. Deve ser ressaltado que 100% dos casos de LV apresentaram forte reação positiva para IgG, o que caracteriza a ativação policlonal de células B observada nos pacientes afetados pela leishmaniose visceral (LIMA *et al.*, 2014). O perfil de IgG1 e IgG2 foi avaliado nos soros positivos para IgG total. Entre os indivíduos assintomática, 40,23% do grupo IAI e 46,94% do grupo IAR foram para IgG1, somente 13,79% do grupo IAI e 14,29% do grupo IAR mostram resultados positivos para IgG2 e 10,34% do grupo IAI e 12,24% do grupo IAR apresentaram níveis detectáveis de IgG1 e IgG2 simultaneamente. Importante salientar que todos os soros do grupo sintomático, tanto do perfil ISI como ISR, foram negativos para IgG1 e IgG2. Já os soros de pacientes com LV, empregados como controle positivo da reação, mostram altos títulos de IgG1 mas foram todos negativos para IgG2, de acordo com os relatado, visto que IgG1 é considerado um marcador de suscetibilidade à infecção por *Leishmania* (LIMA *et al.*, 2017).

Na prevalência acumulada no espectro assintomático (n=494), os perfis clínico-imunológicos mais frequentes foram IAF (39,1%), seguido do IAI (38,9%) e IAR (22,1%), sugerindo que a hipersensibilidade tardia presente nos indivíduos residentes na área endêmica poderia representar um importante mecanismo na ativação da resposta de células T específicas contribuindo para o controle da infecção (SILVEIRA, *et al.*, 2010a). Desta forma, seria possível inferir que no Município de Amapala residam

indivíduos naturalmente resistentes à infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi*, como já foi descrito em áreas endêmicas de transmissão de LV Brasil, onde indivíduos assintomáticos mostraram características genéticas de resistência a infecção por *L. (L.) infantum chagasi* ligadas ao teste de hipersensibilidade tardia positiva a antígenos específicos (JERONIMO; HOLST, *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2010a). O perfil IAI, que se caracteriza por ter uma resposta humoral positiva, porém, uma resposta celular negativa apresentou maior frequência na prevalência (33%) do que nos inquéritos da I e II incidência (14,3%), sugerindo que este perfil deve ser encontrado com maior frequência em casos de infecção recentes, uma vez que, ao longo do período do estudo, todos estes indivíduos converteram a prova de hipersensibilidade tardia e nenhum deles desenvolveu lesões cutâneas compatíveis com LCNU ou atípica.

Já nos indivíduos sintomáticos, pacientes acometidos por LCNU (n=159) os perfis clínico-imunológicos mais frequentes observados na prevalência acumulada foram ISF e ISR com 36,5% e 24,2%, respectivamente; o que mostra a frequente resposta positiva ao teste de hipersensibilidade tardia nos pacientes com LCNU, caracterizando uma boa resposta imune celular no controle da infecção (SOSA-OCHOA *et al.*, 2020b). Estes dados podem ser correlacionados com as características histopatológicas da lesão cutânea, que foi caracterizada por um infiltrado inflamatório mononuclear na derme com a presença, principalmente, de linfócitos, seguido de macrófagos com a formação de granulomas epitelióides e escasso parasitismo (SANDOVAL PACHECO *et al.*, 2018). Além disso, importante salientar a evidente participação de linfócitos T CD8⁺ nas lesões de pele, que apresentam positiva e forte correlação com células IFN- γ ⁺, contribuindo para a ativação da população de macrófagos que foi caracterizada, como sendo, predominantemente, do tipo M1 com expressão positiva de NOS (SANDOVAL PACHECO *et al.*, 2021).

Avaliando a distribuição da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* por faixa etária, observamos que no espectro assintomático da infecção, o perfil de IAI foi o mais frequente na prevalência. Porém, depois dos seguimentos nos inquéritos de incidência I e II, o perfil mais frequente foi de IAF, mostrando o perfil de resistência à infecção da população estudada. A conversão da prova de hipersensibilidade tardia dos indivíduos em todas as faixas etárias examinadas na primeira (12 meses) e segunda incidência (24 meses) demonstrou que a imunidade adquirida aumenta com a idade, de acordo com o observado em nosso estudo onde a faixa etária com maior exposição à infecção foi de indivíduos maiores que 21 anos idade. Esses resultados diferem dos observados em outros estudos prospectivos realizados, principalmente, no Brasil onde a faixa etária de maior prevalência da infecção foi em indivíduos menores que 21 anos de idade (NASCIMENTO *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2010a). Além disso, ressaltamos que no espectro sintomático da infecção, o perfil mais frequente observado foi de ISF, o que pode em parte explicar porque nenhum paciente acometido pela infecção cutânea por *L. (L.) infantum chagasi* em nosso estudo desenvolveu a forma visceral da doença, mesmos nas crianças menores de 5 anos, como acontece em outros estudos prospectivos desenvolvidos na América do Sul (NASCIMENTO *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2010a).

Este estudo representa o primeiro relato sobre a evolução da dinâmica da infecção humana de *L. (L.) infantum chagasi* na Mesoamérica.

Na evolução da dinâmica da infecção no espectro assintomático, a principal observação encontrada foi o predomínio resposta de hipersensibilidade tardia, o que correlacionamos com as características epidemiológicas de transmissão da infecção descritas no Município de Amapala. Ao longo do estudo, aproximadamente, 24% dos indivíduos expostos à infecção por *L. (L.) infantum chagasi* converteram diretamente

a prova de DTH sem evidência no desenvolvimento de resposta humoral com a produção de anticorpos da classe IgG ou IgM. Os indivíduos no perfil de IAI que desenvolveram anticorpos sem converter a prova de DTH na primeira prevalência (12 meses), ao final do estudo na segunda prevalência (24 meses) caminharam para o perfil IAF. É importante salientar, que nenhum caso de IAF, quer seja determinado na prevalência ou na evolução da infecção, durante a primeira e segunda incidência, evoluiu para espectro sintomático da infecção para a forma cutânea atípica (LCNU) ou para a forma visceral.

Já a evolução da dinâmica da infecção no espectro clínico sintomático, os principais achados foram aqueles relacionados ao perfil de ISP. De um total de 26 casos diagnosticados ao longo do estudo, 59% deles converteram a prova de imunidade celular (DTH⁺) evoluindo para o perfil de ISF, sem receber tratamento específico, 18% dos pacientes converteram as duas provas imunológicas evoluindo para o perfil de IRS e 18% converteu somente a imunidade humoral evoluindo para o perfil ISI. Assim, essas observações confirmam, fortemente, que o perfil ISP trata-se de um estágio inicial da infecção, a partir do qual, a evolução da infecção progride dependendo das características genéticas da resposta imune do hospedeiro vertebrado (RODRIGUES-NETO *et al.*, 2018; WEIRATHER *et al.*, 2017). Outra observação importante foi a evolução da infecção no perfil ISI, que apesar de ser caracterizada pela presença de resposta imune humoral, não mostrou nenhuma diferença clínica com os pacientes localizados no polo de resposta imune celular, e ao final do tempo do estudo acabou evoluindo para os perfis ISR e ISF, no polo de resistência. Os resultados apresentados sugerem que, ao contrário do curso da infecção assintomática, a imunidade celular se sobrepôs à humoral na infecção sintomática, o que, possivelmente, pode estar correlacionado à forte resposta imune

celular observada *in situ* nas lesões de pele que foram caracterizadas por uma resposta inflamatória mononuclear com a presença de granulomas e abundantes células CD8⁺ com correlação direta positiva com células produtoras de IFN- γ (SANDOVAL *et al.*, 2021; SANDOVAL PACHECO *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos neste estudo auxiliam a estabelecer características da imunopatogenia da infecção por *L. (L.) infantum chagasi* em habitantes da zona do Pacífico de Honduras, desde a exposição do hospedeiro ao parasita com o desenvolvimento de uma resposta imune humoral precoce, caracterizada pela presença de imunoglobulinas principalmente da classe M (ELISA-IgM⁺) até o desenvolvimento de uma resposta imune celular específica caracterizada pela positividade ao teste de hipersensibilidade tardia frente a antígeno específico (DTH⁺).

Salientamos que, este estudo representa o primeiro relato relacionado às características clínicas e imunológicas da infecção por *L. (L.) infantum chagasi* humana no Município de Amapala, Honduras. Todo o conhecimento adquirido por nosso grupo deverá ser utilizado no acompanhamento clínico dos casos de LCNU em áreas endêmicas do país, a fim de prover novas ferramentas diagnósticas e de tratamento para os pacientes moram na área endêmica de LCNU em América Central.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. A combinação entre os exames clínico, parasitológico e imunológicos (ELISA e DTH) mostraram ser ferramentas importantes para o diagnóstico da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* na região sul de Honduras, apontando para uma alta prevalência da infecção na área, 73,6%.
2. A combinação entre os exames clínico, parasitológico e imunológicos (ELISA e DTH) permitiu a caracterização de sete perfis clínico-imunológicos da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi*, 3 de infecção assintomática e 4 de infecção sintomática.
3. A leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU) ou atípica foi mais comum em adultos jovens, do sexo feminino, as lesões, em geral, eram únicas, menores de 5 mm e acometiam principalmente os membros superiores e inferiores.
4. A distribuição geográfica da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* na Isla del Tigre, Município de Amapala, Honduras, mostrou maior número de casos na região norte da ilha (58,88%), região esta, que apresenta alta abundância de flebotomíneos das espécies *Lu. longipalpis* e *Pintomyia evansi*.
5. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* foi confirmada como agente etiológico responsável pelas lesões cutâneas atípicas no sul de Honduras.
6. Os pacientes acometidos por LCNU mostraram discreta resposta imune humoral sistêmica, caracterizada por baixos títulos de IgM e IgG, com ausência de detecção das subclasses IgG1 e IgG2.
7. Os pacientes acometidos por LCNU apresentaram ausência de resposta imune celular sistêmica, caracterizada por concentrações de citocinas Th1, Th2 e Th17 semelhantes a indivíduos saudáveis.

8. O perfil de infecção sintomática final – ISF (ELISA-/DTH+) foi o mais prevalente encontrado nos casos de LCNU, apontando para o caráter benigno e de resistência da infecção cutânea por *L. (L.) infantum chagasi* na região do Pacífico de Honduras.
9. O perfil de infecção sintomática precoce - ISP (DTH-/ELISA-) foi um achado inédito no estudo. A grande maioria destes indivíduos converteu a prova de hipersensibilidade tardia, 18% evoluiu para o perfil de infecção sintomática resistente – ISR e 59% para o perfil de infecção sintomática final – ISF confirmando o perfil de resistência da infecção cutânea humana por *L. (L.) infantum chagasi*.
10. Nenhum dos pacientes acometidos por LCNU evoluiu para a forma visceral da doença no período de dois anos, sugerindo que a enfermidade cutânea e a visceral são entidades diferentes da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* na América Central.
11. A dinâmica da evolução da infecção assintomática mostrou que 26,2% e 17,1% e dos indivíduos no perfil de infecção assintomática inicial - ISP evoluíram para o perfil de infecção assintomática resistente – IAR e infecção assintomática final - IAF; assim como 3,7% e 24% dos indivíduos não infectados evoluíram para IAR e IAF, respectivamente, mostrando o perfil de resistência da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* na região sul de Honduras.
12. Os resultados obtidos neste estudo são inéditos, ajudam a compreender melhor a patogenia da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* na América Central, especialmente, da forma cutânea atípica da doença; assim como podem auxiliar na definição de políticas públicas de controle e tratamento da infecção na região da Mesoamérica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, C. M.; ROBLES, N.; PALACIOS, X.; VEGA, C. *et al.* Respuesta inmune celular en enfermos con Leishmaniasis cutánea atípica. **Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter**, 15, n. 1, p. 25-29, 1999.

AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNETT, A.; VOTYPKA, J. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 3, p. e0004349, Mar 2016.

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ARAUJO FLORES, G. V.; SANDOVAL PACHECO, C. M.; SOSA OCHOA, W. H.; GOMES, C. M. C. *et al.* Th17 lymphocytes in atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Central America. **Parasite Immunol**, p. e12772, Jun 30 2020.

ARAUJO FLORES, G. V.; SANDOVAL PACHECO, C. M.; TOMOKANE, T. Y.; SOSA OCHOA, W. *et al.* Evaluation of Regulatory Immune Response in Skin Lesions of Patients Affected by Nonulcerated or Atypical Cutaneous Leishmaniasis in Honduras, Central America. **Mediators Inflamm**, 2018, p. 3487591, 2018.

ARGÜELLO VARGAS, S. **Caracterización del hábitat y distribución de *Lutzomya longipalpis* (Diptera: Psychodidae) en sitios con historia previa de leishmaniasis cutánea atípica en Liberia (Guanacaste, Costa Rica)**. [dissertação] Costa Rica Universidad Nacional de Costa Rica 2006. - Disponível em: <http://hdl.handle.net/123456789/206>.

BADARO, R.; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; SAMPAIO, D. *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, 154, n. 6, p. 1003-1011, Dec 1986.

BELLI, A.; GARCIA, D.; PALACIOS, X.; RODRIGUEZ, B. *et al.* Widespread atypical cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) Chagasi* in Nicaragua. **Am J Trop Med Hyg**, 61, n. 3, p. 380-385, Sep 1999.

BOTERO, D.; RESTREPO, M. Leishmaniosis. *In: Parasitosis Humanas*. 3era ed. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), 1998. p. 228-251.

BOTTINELLI, O. R.; ULON, S. N.; MARDER, G.; CABRAL ORTIZ, D. **Uso de Sistemas de Información Geográfica (SIG) para la vigilancia de enfermedades vectoriales en áreas de fronteras**. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. 2006.

CAMPOS-PONCE, M.; PONCE, C.; PONCE, E.; MAINGON, R. *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous

and visceral leishmaniasis foci in Central America. **Exp Parasitol**, 109, n. 4, p. 209-219, 2005.

CAMPOS, M. B.; DO REGO LIMA, L. V.; DE LIMA, A. C. S.; DOS SANTOS, T. V. *et al.* Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*. **PLoS One**, 13, n. 3, 2018.

CARRASCO, J.; MORRISON, A.; PONCE, C. Behaviour of *Lutzomyia longipalpis* in an area of southern Honduras endemic for visceral/atypical cutaneous leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**, 92, n. 8, p. 869-876, Dec 1998.

CARRILLO, L.; ROBLEDO, S.; I.D., V. Estudios ecoepidemiológicos de foco. Manual Diagnóstico y Control de la Leishmaniasis en Centroamérica. . Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia. Antioquia, Colombia. 2010.

CASTRO, G. A. L.; PONCE, C.; PONCE, E.; SIERRA, M. Caracterización de pacientes con leishmaniasis cutánea atípica. **Rev Med Hondur VOLUMEN 76-No. 3 Julio, Agosto, Septiembre, 2008**, 76, p. 101-107, 2008.

CONVIT, J.; ULRICH, M.; PÉREZ, M.; HUNG, J. *et al.* Atypical cutaneous leishmaniasis in Central America: possible interaction between infectious and environmental elements. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 99, n. 1, p. 13-17, 2005.

CRESCENTE, J. A.; SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. *et al.* A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum* chagasi infection in the Brazilian Amazon region. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 103, n. 12, p. 1250-1256, Dec 2009.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, 22, n. 6, p. 491-502, 2009.

DONOVAN, C. A Possible Cause of Kala-Azar. **The Indian medical gazette**, 38, n. 12, p. 478-478, 1903.

DOS SANTOS, P. L.; DE OLIVEIRA, F. A.; SANTOS, M. L.; CUNHA, L. C. *et al.* The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 1, p. e0004375, Jan 2016.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clin Microbiol Rev**, 26, n. 1, p. 58-85, Jan 2013.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, 137, n. 3-4, p. 214-221, Apr 30 2006.

GRACA, G. C.; VOLPINI, A. C.; ROMERO, G. A.; OLIVEIRA NETO, M. P. *et al.* Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 107, n. 5, p. 664-674, Aug 2012.

HIRATA, K. Y.; OLIVEIRA SOBRINHO, E. B.; RIGON, L.; UTSUNOMIYA, Y. T. *et al.* Exposure to *Leishmania* spp. infection and *Lutzomyia* spp. in individuals living in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 53, p. e20190320, 2019.

HOTEZ, P. J. The Four Horsemen of the Apocalypse: Tropical Medicine in the Fight against Plague, Death, Famine, and War. **Am J Trop Med Hyg**, 87, n. 1, p. 3-10, Jul 2012.

IEIPAV. Manual de Manejo de Enfermedades Parasitarias Prioritarias en Honduras. Tegucigalpa, Honduras: Organización Panamericana de la Salud, AZER Impresos 2009.

JERONIMO, S. M.; DUGGAL, P.; ETTINGER, N. A.; NASCIMENTO, E. T. *et al.* Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. **J Infect Dis**, 196, n. 8, p. 1261-1269, Oct 15 2007.

JERONIMO, S. M.; HOLST, A. K.; JAMIESON, S. E.; FRANCIS, R. *et al.* Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. **Genes Immun**, 8, n. 7, p. 539-551, Oct 2007.

JERONIMO, S. M.; TEIXEIRA, M. J.; SOUSA, A.; THIELKING, P. *et al.* Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. **Clin Infect Dis**, 30, n. 3, p. 608-609, Mar 2000.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KELLY, J. M.; LAW, J. M.; CHAPMAN, C. J.; VAN EYS, G. J. *et al.* Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**, 46, n. 2, p. 253-263, Jun 1991.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, 187, n. 1089, p. 409-419, Nov 19 1974.

KLATT, S.; SIMPSON, L.; MASLOV, D. A.; KONTHUR, Z. *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. **PLoS Negl Trop Dis**, 13, n. 7, p. e0007424, 2019.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 81, n. 3, p. 517, 1987.

LARANJEIRA, D. F.; MATTA, V. L.; TOMOKANE, T. Y.; MARCONDES, M. *et al.* Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-endemic area. **Rev Saude Publica**, 48, n. 4, p. 563-571, Aug 2014.

LEISHMAN, W. B. Note on the Nature of the Parasitic Bodies found in Tropical Splenomegaly. **Br Med J**, 1, n. 2249, p. 303-303, 1904.

LIMA, L. V. D. R.; CARNEIRO, L. A.; CAMPOS, M. B.; DOS SANTOS, T. V. *et al.* Further evidence associating IgG1, but not IgG2, with susceptibility to canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum* chagasi-infection. **Parasite**, 24, 2017.

LIMA, L. V. D. R.; RAMOS, P. K. S.; CAMPOS, M. B.; SANTOS, T. V. D. *et al.* Preclinical diagnosis of American visceral leishmaniasis during early onset of human *Leishmania (L.) infantum* chagasi-infection. **Pathog Glob Health**, 108, n. 8, p. 381-384, 2014.

MATUTE, N.; ESPINOZA, C.; ALGER, J.; PADGETT, D. *et al.* Caracterización clínico-epidemiológica de pacientes con Leishmaniasis atendidos en el Hospital Escuela. **Rev Med Hondur**, 77, n. 1, p. 7-15, 2009.

MEJIA, A.; MATAMOROS, G.; FONTECHA, G.; SOSA-OCHOA, W. Bionomic aspects of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis*, proven vectors of *Leishmania infantum* in an endemic area of non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras. **Parasit Vectors**, 11, n. 1, p. 15, Jan 5 2018.

MOODY, S. F. Molecular variation in *Leishmania*. **Acta Trop**, 53, n. 3-4, p. 185-204, May 1993..

MORAL, L.; RUBIO, E.; MOYA, M. A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacanti region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 96, n. 2, p. 129-132, 2002.

MULLER, I.; PEDRAZZINI, T.; FARRELL, J. P.; LOUIS, J. T-cell responses and immunity to experimental infection with *leishmania major*. **Annu Rev Immunol**, 7, p. 561-578, 1989.

NASCIMENTO, M. D. D. S. B.; SOUZA, E. C.; SILVA, L. M. D.; LEAL, P. D. C. *et al.* Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermoreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 21, p. 1801-1807, 2005.

NEVA, F. A.; PONCE, C.; PONCE, E.; KREUTZER, R. *et al.* Non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras fails to respond to topical paromomycin. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 91, n. 4, p. 473-475, Jul-Aug 1997.

NOYES, H.; CHANCE, M.; PONCE, C.; PONCE, E. *et al.* *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. **Exp Parasitol**, 85, n. 3, p. 264-273, Mar 1997.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in immunology**, 28, n. 9, p. 378-384, 2007.

PAMPIGLIONE, S.; LA PLACA, M.; SCHLICK, G. Studies on mediterranean Leishmaniasis. I. An outbreak of visceral leishmaniasis in Northern Italy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 68, n. 5, p. 349-359, 1974.

PAMPIGLIONE, S.; MANSON-BAHR, P. E.; LA PLACA, M.; BORGATTI, M. A. *et al.* Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 69, n. 1, p. 60-68, 1975.

PONCE; PONCE, E.; MORRISON, A.; CRUZ, A. *et al.* Leishmania donovani chagasi: new clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. **Lancet**, 337, n. 8733, p. 67-70, Jan 12 1991.

RAMOS, P. K.; CARVALHO, K. I.; ROSA, D. S.; RODRIGUES, A. P. *et al.* Serum Cytokine Responses over the Entire Clinical-Immunological Spectrum of Human Leishmania (L.) infantum chagasi Infection. **Biomed Res Int**, 2016, p. 6937980, 2016.

RAVEL, C.; CORTES, S.; PRATLONG, F.; MORIO, F. *et al.* First report of genetic hybrids between two very divergent Leishmania species: Leishmania infantum and Leishmania major. **International Journal for Parasitology**, 36, n. 13, p. 1383-1388, 2006/11/01/ 2006.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to Leishmania major. **Annu Rev Immunol**, 13, p. 151-177, 1995.

REYES, E.; RUÍZ, H.; ESCOBEDO, J.; RODRÍGUEZ, I. *et al.* Situación actual y perspectivas para el estudio de las enfermedades zoonóticas emergentes, remergentes y olvidadas en la Península de Yucatán México. **Tropical and Subtropical Agrosystems**, 14, p. 35-54, 2011 2011.

RODRIGUES-NETO, J. F.; MONTEIRO, G. R.; KEESEN, T. S. L.; LACERDA, H. G. *et al.* CD45RO+ T Cells and T Cell Activation in the Long-Lasting Immunity after Leishmania infantum Infection. **Am J Trop Med Hyg**, 98, n. 3, p. 875-882, Mar 2018.

RODRIGUES, V.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; LAFORGE, M.; SILVESTRE, R. *et al.* Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasit Vectors**, 9, p. 118, Mar 1 2016.

ROGERS, M. B.; DOWNING, T.; SMITH, B. A.; IMAMURA, H. *et al.* Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated Leishmania population. **PLoS Genet**, 10, n. 1, p. e1004092, Jan 2014.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes. **Science**, 223, n. 4643, p. 1417-1419, Mar 30 1984.

SÁNCHEZ, L.; SÁENZ, E.; JULIAPANCORBO; ZEGARRA, R. *et al.* Leishmaniasis. **Dermatología Peruana**, 14, n. 2, p. 82-98, 2004.

SANDOVAL, C.; ARAUJO, G.; SOSA, W.; AVALOS, S. *et al.* In situ cellular immune response in non-ulcerated skin lesions due to *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 27, 2021.

SANDOVAL PACHECO, C. M.; ARAUJO FLORES, G. V.; FAVERO FERREIRA, A.; SOSA OCHOA, W. *et al.* Histopathological features of skin lesions in patients affected by non-ulcerated or atypical cutaneous leishmaniasis in Honduras, Central America. **Int J Exp Pathol**, 99, n. 5, p. 249-257, Oct 2018.

SANDOVAL PACHECO, C. M.; ARAUJO FLORES, G. V.; GONZALEZ, K.; DE CASTRO GOMES, C. M. *et al.* Macrophage Polarization in the Skin Lesion Caused by Neotropical Species of *Leishmania* sp. **J Immunol Res**, 2021, p. 5596876, 2021.

SANTOS, K. E.; BERMÚDEZ, J.; LUTZ, E. L.; ALGER, J. *et al.* Estudio clínico-epidemiológico de leishmaniasis cutánea atípica en Reitoca, zona endémica del sur de Honduras. **Revista Médica de los Post Grados de Medicina UNAH Vol**, 9, n. 1, p. 48, 2006.

SCHAUT, R. G.; LAMB, I. M.; TOEPP, A. J.; SCOTT, B. *et al.* Regulatory IgDhi B Cells Suppress T Cell Function via IL-10 and PD-L1 during Progressive Visceral Leishmaniasis. **J Immunol**, 196, n. 10, p. 4100-4109, May 15 2016.

SILVEIRA, F. T. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 113, n. 9, p. 505-516, 2019.

SILVEIRA FT; MULLER SFR; LAURENTI MD. Leishmaniose Tegumentar Americana. *In*: BELDA JUNIOR W, D. C. N., CRIADO PR (Ed.). **Tratado de Dermatología**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2018. cap. 72, p. 1691-1700.

SILVEIRA, F. T.; BLACKWELL, J. M.; ISHIKAWA, E. A.; BRAGA, R. *et al.* T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. **Parasite Immunol**, 20, n. 1, p. 19-26, Jan 1998.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CRESCENTE, J. A.; DE SOUZA, A. A. *et al.* A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 104, n. 8, p. 529-535, Aug 2010a.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; DE SOUZA, A. A.; CAMPOS, M. B. *et al.* Further evidences on a new diagnostic approach for monitoring human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil. **Parasitol Res**, 106, n. 2, p. 377-386, Jan 2010b.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; DE SOUZA, A. A. *et al.* Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 85, n. 6, p. 735-738, 1991.

SOSA-OCHOA W; MORALES CORTEDANO X; ARGÜELLO A; ZUNIGA C *et al.* Ecoepidemiología de la Leishmaniasis cutánea no ulcerada en Honduras. **Revista Ciencia y Tecnología, UNAH**, 14, n. 2014, p. 115-128, 2014.

SOSA-OCHOA, W.; VARELA AMADOR, J.; LOZANO-SARDANETA, Y.; RODRIGUEZ SEGURA, G. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* DNA in *Pintomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis* in Honduras. **Parasit Vectors**, 13, n. 1, p. 593, Nov 23 2020a.

SOSA-OCHOA, W.; ZUNIGA, C.; CHAVES, L. F.; ARAUJO FLORES, G. V. *et al.* Clinical and Immunological Features of Human *Leishmania (L.) infantum*-Infection, Novel Insights Honduras, Central America. **Pathogens**, 9, n. 7, Jul 10 2020b.

TEIXEIRA, D. G.; MONTEIRO, G. R. G.; MARTINS, D. R. A.; FERNANDES, M. Z. *et al.* Comparative analyses of whole genome sequences of *Leishmania infantum* isolates from humans and dogs in northeastern Brazil. **Int J Parasitol**, 47, n. 10-11, p. 655-665, Sep 2017.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. Blackwell Science, 2007. 978-1-405-15627-1.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. **Trends Parasitol**, 18, n. 9, p. 405-410, Sep 2002.

TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, F. J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 87, n. 7, p. 2414-2418, 1990.

VÉLEZ, I. D.; RESTREPO, S. M. R.; GUTIÉRREZ, C. T.; BONILLA, L. M. C. *et al.* **Manual de Procedimientos para el Diagnóstico y Control de la Leishmaniasis en Centro América** Medellín, Colombia: Universidad de Antioquía, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, 2010. 978-958-714-389-8.

WEIRATHER, J. L.; DUGGAL, P.; NASCIMENTO, E. L.; MONTEIRO, G. R. *et al.* Comprehensive candidate gene analysis for symptomatic or asymptomatic outcomes of *Leishmania infantum* infection in Brazil. **Ann Hum Genet**, 81, n. 1, p. 41-48, Jan 2017.

WHO. **Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. Ginebra, Suiza. 2010. (949; WHO technical report series).

YOUNG, D.; DUNCAN, A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville. Florida 32614-0103. USA: Taylor and Francis 1994.

ZELEDON, R.; HIDALGO, H.; VIQUEZ, A.; URBINA, A. Atypical cutaneous leishmaniasis in a semiarid region of north-west Costa Rica. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 83, n. 6, p. 786, Nov-Dec 1989.

ZELEDON, R.; MACAYA, G.; PONCE, C.; CHAVES, F. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in Honduras, Central America. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 76, n. 2, p. 276-277, 1982.

ZIJLSTRA, E. E.; EL-HASSAN, A. M.; ISMAEL, A.; GHALIB, H. W. Endemic kala-azar in eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, 51, n. 6, p. 826-836, Dec 1994.

9. APÊNDICES

9. APÊNDICES

9.1 APÊNDICE 1

Ficha Clínica del Paciente



Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de São Paulo
 Departamento de Parasitología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras
 Ficha Clínica del Paciente



Familia: _____	Fecha: ____/____/____	Codigo: _____
DATOS GENERALES DEL PACIENTE		
Nombre Completo: _____		
Fecha de Nacimiento: ____/____/____	Edad: _____	
Sexo: _____	Peso: _____	Libras: _____
Embarazo: SI: _____ NO: _____	Meses: _____	
Ocupación: _____		
PROCEDENCIA DEL CASO		
Departamento: _____	Municipio: _____	
Localidad o Barrio: _____	Telefono: _____	
Residencia Actual: _____		
¿Siempre vivió en esta localidad?: SI: _____ NO: _____		
¿Donde vivía antes?: _____ Hace cuanto tiempo: _____		
¿Tiene perros en casa?: SI: _____ NO: _____ Cantidad: _____		
DATOS CLINICOS		
Características de la lesión:		
LCNU: _____	LV: _____	Sin clínica: _____
Aspecto: Ulcerada _____ No Ulcerada: _____	Signos: SI: _____ NO: _____	
No. de lesiones: _____	Síntomas: SI: _____ NO: _____	
Tiempo de evolución: _____		
Localización: Cara: _____	Tronco: _____	Extremidades: _____
Diámetro de la lesión: _____		
TIPO DE MUESTRA		
Cultivo: _____	Biopsia: _____	MO: _____
P. Montenegro: _____	Serología: _____	Sangre Total: _____
TRATAMIENTO		
¿Ha recibido tratamiento previo para Leishmaniasis? SI: _____ NO: _____		
Concluyó el tratamiento? SI: _____ NO: _____		
¿Cuántas veces a recibido tratamiento? _____		
Nombre de la persona que llena la Ficha: _____		
RESULTADOS		
TEST DE MONTENEGRO (diámetro en mm): _____		
RIFI: _____		

9.2 APÉNDICE 2

Consentimiento informado

Escuela de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH)
Secretaría de Salud de Honduras
Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de São Paulo, Brasil.

Infección humana por *Leishmania (L.) infantum/chagasi* en Centro América, con énfasis en la caracterización clínico-inmunológica en Honduras, expresión génica y el diagnóstico molecular en Brasil, años 2014 - 2017.

Por este medio le estamos invitando a participar a Usted, en un estudio de investigación, que tiene como propósito investigar las características clínico-epidemiológicas de la Leishmaniasis, transmitida por *Leishmania (L.) infantum/chagasi* en Honduras. Este estudio se está realizando en Brasil y Honduras.

La infección humana producida por *Leishmania (L.) infantum/chagasi* está comúnmente relacionada a una enfermedad conocida como Leishmaniasis visceral, que representa un estado excepcional en personas susceptibles a la infección y que evoluciona, de forma progresiva hacia la enfermedad activa.

No obstante la Leishmaniasis visceral es conocida desde inicios del siglo pasado, cuando se registraron los primeros casos de la enfermedad en la República Argentina, y que la Leishmaniasis Visceral es apenas el inicio en esta interacción con el agente infeccioso.

Si usted acepta participar en este estudio, llenará con su nombre esta hoja y contestará las preguntas que están incluidas en el cuestionario, los cuales recibirán un código y serán guardados, por lo que solamente el equipo de investigadores y el personal asignado para recolección de las muestras conocerá sus datos, luego se le tomarán dos muestras de sangre en diferentes momentos, a las que solamente se le colocará un código y la fecha de colección, dichas muestras NO TENDRAN SU NOMBRE, por lo que al personal encargado de analizar las muestras no le será posible identificarlo.

Se garantiza que la información que usted provea no será identificada públicamente; todo esto se llevará a cabo para ASEGURAR LA TOTAL PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD de su información.

Su participación en este estudio es libre y voluntaria y no remunerada, usted está en toda la disposición de negarse a participar.

Si Ud. decide participar los procedimientos que se le realizarán son los siguientes: 1. Se procederá a la aplicación de una prueba de hipersensibilidad tardía para determinar si existe una respuesta celular a la infección con parásitos de *Leishmania* 2. Se le tomará una muestra de sangre venosa del antebrazo para determinar anticuerpos contra *Leishmania* y la determinación de niveles de citoquinas. 3. Se tomará parte del tejido de la lesión (Biopsia) para la realizar pruebas de inmunofluorescencia e histoquímicas en el laboratorio. Los riesgos que existen al momento de tomar las muestras son mínimos para su salud, lo único que puede sentir es prurito en el área de aplicación de la prueba de hipersensibilidad tardía, en ocasiones poco frecuentes se puede formar un hematoma en el lugar donde se extrae la sangre y en el caso de la biopsia podría presentar una pequeña infección. Si usted presenta cualquier molestia debido a la aplicación o toma de muestra el equipo de investigación lo orientará y suplirá en las medidas a tomar.

Las muestras serán empleadas para realizar las diferentes pruebas de laboratorio destinadas a la investigación de Leishmaniasis en este estudio Y NO SE UTILIZARAN LAS MUESTRAS PARA OTRO ESTUDIO DIFERENTE A ESTE.

9.3 APÉNDICE 3

Asentimiento

Escuela de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH)
Secretaría de Salud de Honduras
Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de São Paulo, Brasil.

Infección humana por *Leishmania (L) infantum/chagasi* en Centro América, con énfasis en la caracterización clínico-inmunológica en Honduras, expresión génica y el diagnóstico molecular en Brasil, años 2014 - 2017.

Queremos contarle acerca de un estudio de investigación que estamos realizando. Un estudio de investigación, que es una manera de aprender acerca de algo que no sabemos. Quisiéramos conocer más sobre *Leishmania*, que es un parásito que puede causarle lesiones (granos) en la piel o una inflamación en su abdomen. Queremos saber cuántos niños están infectados por este parásito. Le estamos preguntando si quiere participar de este estudio, ya que con su ayuda podríamos entender más esta enfermedad.

Quisiéramos saber si usted tiene el parásito *de Leishmania*. Usted puede elegir o no participar en este estudio de investigación. Si elige participar, nosotros vamos a tomar parte de su lesión con un instrumento de laboratorio y tomaremos una muestra de sangre de su brazo izquierdo o derecho. La sangre y la muestra de la lesión, serán estudiadas para ver si el parásito de *Leishmania* está presente. Estas muestras las llevaremos a un laboratorio, donde realizaremos todos los estudios que nos dirán si usted tienes el parásito o no. Si tiene el parásito, le avisaremos a sus padres y ellos le traerán al doctor para que reciba el tratamiento adecuado.

A veces les pasan cosas a las personas que participan en estudios de investigación que pueden lastimarlas o hacer que se sientan mal. Estas cosas se llaman riesgos. Los riesgos de este estudio son que le puede doler el brazo cuando lo pinchemos. También puede ponerse morado el lugar donde le tomemos la muestra. Si usted se siente enferma/o y/o dolorida/o, debe decirle a sus padres.

Este estudio nos ayudará a saber si usted tienes este parásito. Si lo tuviese el parásito recibirá los remedios necesarios para que no se enferme. Además, quizás aprenderemos cosas que nos ayudarán a que otros niños no se infecten con este parásito. Este estudio enseñará a la gente la importancia que tiene esta enfermedad.

Probablemente no se lastime por participar en este estudio. Pero si usted se lastima durante el mismo, le comunicaremos a sus padres y les informaremos acerca de cómo cuidarlo.

Puede hacer preguntas en cualquier momento. Puede también preguntar ahora si lo desea. O después. Puede preguntarme a mí o puede hablar con cualquier otra persona en cualquier momento que dure el estudio.

Si tiene preguntas sobre el estudio o cualquier problema que tenga usted o sus padres puede llamar al Dr. Concepción Zúniga al celular # 99322424 o con el Dr. Wilfredo Sosa al teléfono del trabajo-Universidad Nacional Autónoma de Honduras # 2232-5836, ó celular # 99633525.

Usted no tiene obligación de participar en el estudio si no quiere. Nadie se va a enojar con usted si no participa. Solamente le pedimos que nos diga. Y, en el caso que acepte participar, recuerde que puede cambiar de opinión si decide que no quiere estar más.

9.4 APÉNDICE 4



UNAH

FACULTAD DE CIENCIAS

COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

CONSTANCIA DE RESOLUCIÓN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN No. 03-2014

Por este medio el Comité de Ética de Investigación de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (CEI-MEIZ) hace CONSTAR que el proyecto de investigación:

Título del proyecto: "Infección humana por *Leishmania (L) infantum/chagasi* en las Américas, con énfasis en la caracterización clínico-inmunológico en Honduras (América Central), expresión génica y el diagnóstico molecular en Brasil (Sur), años 2014-2017"

Equipo de investigación: Márcia Dalastra Laurenti (Investigadora principal, Brasil), Concepción Zúñiga Valeriano (Investigador principal, Honduras), Wilfredo Humberto Sosa (Co-investigador), Carmen María Sandoval Pacheco (Estudiante co-investigador) y Gabriela Venicia Araujo Flores (Estudiante co-investigador).

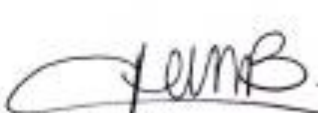
Institución (es): Laboratorio de Patología en Enfermedades Infecciosas (LIMS0), Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Sao Paulo (USP); Ministerio de Salud Pública de Honduras; Escuela de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH); Laboratorio de Leishmaniosis, Instituto Evandro Chagas (IEC, SVS, MS), Ananindeua, Pará; y Núcleo de Medicina Tropical, Universidad Federal de Pará (UFPA), Belém, Pará.

Fecha de presentación al comité: 05 / 05 / 2014

Fue sometido a un proceso de revisión y análisis y en consecuencia fue **APROBADO**

Duración de la aprobación: 01 / 08 / 2014 al 01 / 08 / 2015

Para los fines de los interesados se les extiende la presente a los veintiocho días del mes de julio del 2014.


Dra. Wendy Murillo
Presidente CEI-MEIZ




Lic. Judith Barrios Borjas
Secretaria CEI-MEIZ

9.5 APÊNDICE 5

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DO ESPECTRO CLÍNICO-IMUNOLÓGICO DA INFECÇÃO HUMANA POR *Leishmania (L.) infantum chagasi* EM HONDURAS, AMÉRICA CENTRAL.

Pesquisador: Marcia Dalastra Laurenti

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 55381216.0.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.818.283

Apresentação do Projeto:

Em Honduras a infecção humana por *L. infantum chagasi* tem apresentado um comportamento atípico, ora causando leishmaniose cutânea em adolescentes e adultos jovens, ora causando leishmaniose visceral em crianças menores de dez anos.

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo onde as pessoas de uma região serão seguidas para determinar a prevalência e incidência de infecção por *L. infantum chagasi* e descrever as manifestações clínicas da doença.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do estudo é caracterizar o espectro clínico-imunológico da infecção humana por *L. (L.) infantum chagasi* em Honduras

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pacientes serão submetidos a reação intradérmica de Montenegro, a um questionário, coleta de amostra de sangue. Eles serão avaliados por médicos locais

OS riscos são mínimos. OS pesquisadores enviaram carta do Instituto Evandro Chagas atestando a qualidade dos reagentes usados na reação de Montenegro.

O benefício é o acesso à avaliação médica e a testes diagnósticos.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.818.283

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa é importante para a saúde pública e maior compreensão de uma doença negligenciada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi alterado e inclui agora a reação de Montenegro

foi incluída uma versão em Português.

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foi incluída a carta do comite de ética de Honduras indicando aprovação por mais um ano.
as pendências foram respondidas

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_673207.pdf	25/10/2016 15:38:40		Aceito
Outros	carta_evandro_chagas.pdf	25/10/2016 15:37:14	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Outros	comite_honduras_2016.pdf	25/10/2016 15:36:42	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_espanhol_portugues.doc	25/10/2016 15:34:50	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Outros	cartapesqaoCEP.pdf	08/09/2016 13:20:45	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuenciahonduras.pdf	08/09/2016 13:18:10	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOREVISADO.docx	08/09/2016 13:16:44	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Brochura Pesquisa	DocCepFmusp.pdf	18/04/2016 16:46:26	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	18/04/2016 15:06:05	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.818.283

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Novembro de 2016

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

9.6 APÉNDICE 6



Article

Clinical and Immunological Features of Human *Leishmania (L.) infantum*-Infection, Novel Insights Honduras, Central America

Wilfredo Sosa-Ochoa ^{1,2}, Concepción Zúniga ³, Luis Fernando Chaves ⁴ ,
Gabriela Venicia Araujo Flores ¹, Carmen Maria Sandoval Pacheco ¹,
Vania Lúcia Ribeiro da Matta ¹ , Carlos Eduardo Pereira Corbett ¹, Fernando Tobias Silveira ^{5,6}
and Marcia Dalastra Laurenti ^{1,*}

¹ Laboratory of Pathology of Infectious Diseases, Medical School, São Paulo University, São Paulo 01246-903, SP, Brazil; wilfredo.ochoa@usp.br (W.S.-O.); gabyaraflo@usp.br (G.V.A.F.); carmenmsandovalp@usp.br (C.M.S.P.); mattav@usp.br (V.L.R.d.M.); ccorbett@usp.br (C.E.P.C.)

² Microbiology Research Institute, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Tegucigalpa 11101, Honduras

³ Department of Health Surveillance, University School Hospital, Tegucigalpa 11101, Honduras; concepcionzuniga@gmail.com

⁴ Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), Tres Ríos 4-2250, Cartago, Costa Rica; lfchavs@gmail.com

⁵ Parasitology Department, Evandro Chagas Institute (Surveillance Secretary of Health, Ministry of Health), Belém 66090-000, PA, Brazil; fernandotobias@iec.gov.br

⁶ Tropical Medicine Institute, Pará Federal University, Belém 66075-110, PA, Brazil

* Correspondence: mdl Lauren@usp.br

Received: 3 June 2020; Accepted: 7 July 2020; Published: 10 July 2020



Abstract: *Leishmania (Leishmania) infantum* is the etiological agent of both American visceral leishmaniasis (AVL) and non-ulcerated cutaneous leishmaniasis (NUCL) in Honduras. Although AVL is the most severe clinical form of infection, recent studies have shown that human immune response to parasite infection can result in a clinical-immunological spectrum. The overall prevalence rate of infection and clinical-immunological profiles of the *L. (L.) infantum* infection in Amapala municipality, South Honduras was determined. We examined 576 individuals with diagnosis based on combined ELISA (IgG/IgM) and DTH assays. We also used genus-specific kDNA PCR and Hsp70 PCR-RFLP for NUCL cases. Clinical evaluation found 82% asymptomatic and 18% symptomatic individuals. All symptomatic cases (n = 104) showing NUCL were positive for parasites. We identified *L. (L.) infantum* species in 100% of the skin lesion scrapings and in 90% of the blood samples from NUCL cases studied. A total of 320 asymptomatic individuals were exposed (ELISA+ and/or DTH+), providing an overall *L. (L.) infantum* prevalence of 73.6%. Clinical, parasitological, and immunological evaluations suggest seven infection profiles, three asymptomatic and four symptomatic. This represents the first report on clinical and immunological features of human *L. (L.) infantum*-infection in Amapala municipality, Honduras.

Keywords: *Leishmania (L.) infantum*; human infection; cross-sectional study; prevalence; clinical-immunological profiles; Honduras

1. Introduction

Leishmaniasis have a broad clinical and immunological spectrum of manifestations depending on *Leishmania* species, host immune responses, and possibly insect vector saliva factors [1]. In the

New World, *Leishmania (Leishmania) infantum* causes subclinical manifestations and active visceral leishmaniasis (VL), also known as American visceral leishmaniasis (AVL), the latter being potentially fatal if untreated [2–6].

However, in Central America, *L. (L.) infantum*-infections have also shown atypical manifestations in humans, causing frequently non-ulcerated cutaneous leishmaniasis (NUCL) in adolescents and young adults, and sometimes causing AVL in children under ten years [7–10]. It is important to mention that both clinical forms are caused by genotypically similar parasites according to molecular tools [11]. NUCL is clinically characterized by non-ulcerated skin lesions, which most frequently are few and small in size, with chronic evolution, affecting the skin in the form of painless papules, nodules, and erythematous plaques surrounded by a hypopigmented halo [12,13].

Histopathological studies have shown that skin lesions of NUCL cases are characterized by a moderate mononuclear inflammatory infiltrate, predominantly formed by lymphocytes, with the presence of granulomas and scarce parasitism [13,14]. However, the co-occurrence of AVL and NUCL caused by *L. (L.) infantum* in the same geographic area suggests that host immunity factors may be involved in determining these different clinical forms of disease [15,16].

Here, we study the prevalence of human symptomatic and asymptomatic *L. (L.) infantum* infection in the population of Amapala municipality, Honduras. We use clinical, parasitological, and immunological diagnostics based on humoral (ELISA-IgG/IgM) and cellular (DTH skin test) immune responses. This combination of diagnostics renders possible the definition of a clinical-immunological infection spectrum in Central America. In this study, we followed a diagnostic protocol similar to the one used to study human *L. (L.) infantum*-infection in Amazonian Brazil, which described the evolution of clinical-immunological human infection profiles, two symptomatic (symptomatic infection (SI = AVL), oligosymptomatic infection (OSI)) and three asymptomatic (indeterminate initial infection (III), resistant subclinical infection (RSI), and asymptomatic infection (AI)), using results from cellular and humoral immune responses [17–21]. However, considering that, in Central America, *L. (L.) infantum*-infection is almost always dermal (NUCL), the aforementioned diagnostic approach, originally developed for AVL, allowed the identification of seven infection profiles in Amapala municipality, Honduras, three asymptomatic (indeterminate asymptomatic infection (IAI), resistant asymptomatic infection (RAI), and final asymptomatic infection (FAI)), and four symptomatic [indeterminate symptomatic infection (ISI), resistant symptomatic infection (RSI), final symptomatic infection (FSI), and early symptomatic infection (ESI)], which are also described in this study.

2. Results

2.1. Clinical and Demographic Aspects of Studied Subjects

A total of 576 individuals were evaluated from April to June 2017. From the evaluated individuals, 336 (58.3%) were female and 240 (41.7%) were male. Most individuals involved in the study (55.9%) were over 21 years old (Table 1). Skin lesions compatible with NUCL were identified in 104 individuals (18%), while 472 (82%) were apparently asymptomatic. The diagnostic was based on direct examination of Giemsa-stained smears from skin lesion scrapings from each individual, where amastigote forms of *Leishmania* sp. were observed in 100% of NUCL cases using a 100X objective in a light microscopy. The distribution of NUCL cases was not homogeneous regarding age (Table 1). In contrast, there was no difference in the proportion of cases by sex (Table 2). Most NUCL cases came from the northern part of the island, from San Pablo (24%) and Las Pelonas (10.6%) (Table 3).

Table 1. Demographic age profile of the individuals enrolled in the study of *Leishmania (L.) infantum*, Municipality of Amapala, Honduras, 2017.

Characteristics	Patients with NUCL (n = 104)		Patients without NUCL (n = 472)		Total n = (576)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Age (years)						
1–10	21	20.19	38	8.05	59	10.24
11–20	44	42.31	151	31.99	195	33.85
≥21	39	37.50	283	59.96	322	55.90

* $\chi^2 = 20.30$;
df = 1; P = 0.000

* Comparison between patients under 21 with and without injuries. NUCL: non-ulcerated cutaneous leishmaniasis.

Table 2. Demographic profile by sex of the individuals enrolled in the study of *Leishmania (L.) infantum*, Municipality of Amapala, Honduras, 2017.

Characteristics	Patients with NUCL (n = 104)		Patients without NUCL (n = 472)		Total n = (576)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Sex						
F	69	66.35	267	56.57	336	58.33
M	35	33.65	205	43.43	240	41.67

** $\chi^2 = 3.03$;
df = 1; P = 0.082

** Comparison between sex with and without injuries.

Table 3. Distribution of enrolled individuals by location in the study of *Leishmania (L.) infantum*, Municipality of Amapala, Honduras, 2017.

Characteristics	Geographical Coordinates	Patients with NUCL (n = 104)		Patients without NUCL (n = 472)		Total n = (576)	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
Locality							
Amapala Centro	N13.293356; W87.651540	8	7.69	10	2.12	18	3.13
San Pablo	N13.289431; W87.641807	25	24.04	96	20.34	121	21.01
Islitas	N13.260960; W87.623410	4	3.85	59	12.50	63	10.94
Las Pelonas	N13.282870; W87.618000	11	10.58	29	6.14	40	6.94
Tiguolotada	N13.262700; W87.615980	8	7.69	20	4.24	28	4.86
Playa Negra	N13.253710; W87.650100	6	5.77	68	14.41	74	12.85
Los Langues	N13.359536; W87.609056	9	8.65	21	4.45	30	5.21
Puerto Grande	N13.370042; W87.640430	4	3.85	21	4.45	25	4.34
Caracol	N13.282807; W87.658781	3	2.88	92	19.49	95	16.49
San Carlos	N13.334952; W87.715220	2	1.92	1	0.21	3	0.52
Playa Grande	N13.266940; W87.655970	11	10.58	6	1.27	17	2.95
Punta Onda	N13.272660; W87.615800	11	10.58	48	10.17	59	10.24
San Lorenzo	N13.366667; W87.266667	0	0.00	1	0.21	1	0.17
Campo Sol	N13.293356; W87.651540	1	0.96	0	0.00	1	0.17
Guarolita	N13.290137; W87.627655	1	0.96	0	0.00	1	0.17

2.2. Parasitological and Molecular Diagnosis of Clinical Cases

Of the 576 individuals evaluated, 104 (18%) had skin lesions compatible with NUCL. Amastigote forms of *Leishmania* sp. were observed in 100% of these cases by Giemsa staining. To confirm *Leishmania* infection, 30 whole blood samples and 45 skin lesion scrapings (all with positive microscopy) were submitted to a genus-PCR targeting *Leishmania* kDNA and further to the species identification by PCR-RFLPs through *Hae* III digestion of a Hsp70 fragment. All samples analyzed were positive for *Leishmania* sp. Respective to the characterization, Hsp70-RFLP identified *L. (L.) infantum* in 90% (27/30) of the blood samples and in 100% of the skin lesion scrapings (45/45), allowing to confirm *L. (L.) infantum* as the pathogen causing NUCL lesions in Amapala municipality, Honduras (Figure 1).

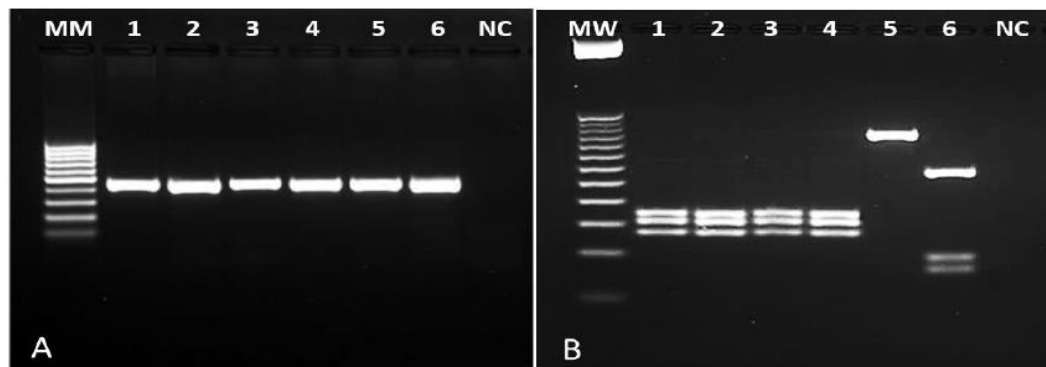


Figure 1. Photograph of agarose gel for samples of NUCL patients. **(A):** genus-specific PCR revealing a 120 bp fragment of *Leishmania* kDNA. **(B):** PCR-RFLP after *Hae* III digestion of a 234 bp Hsp70 fragment. Columns 1–3: lesion scraping samples from NUCL patients; columns 4–6: *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/BH46); *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1995/M15280), respectively. NC: negative control; MW: ladder.

2.3. Clinical Characteristics of NUCL Skin Lesions

Regarding the clinical characteristics of patients with NUCL, we found that most patients (63%/65) had only one lesion (Table 4). The majority of lesions were observed in the extremities and the chest (55% and 32%, respectively). The size of the skin lesion was bigger than 5 mm in 65% of the patients, and 40% ($n = 42$) of them had an evolution <12 months. There was no significant difference (Kruskal–Wallis test, $df = 18$; $P = 0.8920$) between the time of disease progression (months) and the number of skin lesions.

Table 4. Clinical characteristics of symptomatic NUCL, Municipality of Amapala, Honduras.

Characteristics	NUCL	
	(n)	(%)
Number of lesions		
1	65	63
2–3	28	27
4–6	8	8
>6	3	3
Location ($n = 207$)		
Face	26	13
Extremity	114	55
Chest	67	32
Size (mm) ($n = 207$)		
<5	134	65
>5	73	35
Evolution (months)		
<12	42	40
12–23	23	22
24–47	14	14
>48	5	5
Did not remember	20	19

2.4. Prevalence rate of Human *L. (L.) infantum*-Infection in the Municipality of Amapala, Honduras

Human *L. (L.) infantum*-infection at our study site was also studied with humoral and cellular immunological tests (ELISA-IgM/IgG and DTH). Thus, considering that all symptomatic infections (NUCL) were confirmed by parasitological diagnostics (104), the prevalence rate of symptomatic infection was 18%, while among asymptomatic individuals examined (472), 320 were at least exposed according to results from the immunological tests (ELISA-IgM/IgG and DTH), generating an

asymptomatic prevalence of 55.5%. When symptomatic (104) and asymptomatic infections (320) are added, a total of 424 infections increased the prevalence to 73.6% (Table 5).

Table 5. Reactivity to DTH and ELISA-IgG/IgM in clinically asymptomatic and symptomatic (NUCL) human *L. (L.) infantum*-infections, Amapala municipality, Honduras, 2017.

	Asymptomatic n = 472 (%)	Symptomatic (NUCL) n = 104 (%)
IgG+/IgM+/DTH+	18 (3.8)	2 (1.9)
IgG+/IgM-/DTH+	28 (5.9)	4 (3.8)
IgG-/IgM+/DTH+	41 (8.7)	20 (19.2)
IgG-/IgM-/DTH+	66 (14.0)	32 (30.8)
IgG+/IgM+/DTH-	26 (5.5)	2 (1.9)
IgG+/IgM-/DTH-	33 (7.0)	2 (1.9)
IgG-/IgM+/DTH-	108 (22.9)	16 (15.4)
IgG-/IgM-/DTH-	152 (32.2)	26 (25.0)

2.5. Reactivity to DTH/ELISA in Asymptomatic and Symptomatic (NUCL) Individuals

None of the recruited individuals presented any clinical signs of AVL during our study period. Among the 472 individuals in the clinically asymptomatic group, 320 were identified with reactivity either for ELISA (IgG+/IgM+), for DTH+, or for both immunological tests simultaneously, which confirms the immunological diagnosis of infection in 67.8% of the asymptomatic individuals.

We were also able to characterize, among the 320 individuals with asymptomatic infections, three clinical-immunological profiles, namely: (1) indeterminate asymptomatic infection (IAI), characterized by a humoral immune response (ELISA: IgM+/IgG+), however, without detection of cellular immune response (DTH-) IgG+/IgM+/DTH-, IgG+/IgM-/DTH-, and IgG-/IgM+/DTH-; (2) resistant asymptomatic infection (RAI), characterized by humoral (ELISA: IgM+/IgG+) and cellular (DTH+) immune responses IgG+/IgM+/DTH+, IgG+/IgM-/DTH+, and IgG-/IgM+/DTH+; and, still, (3) final asymptomatic infection (FAI), characterized only by detection of cellular immune response (DTH+) IgG-/IgM-/DTH+.

On the other hand, in the 104 individuals with symptomatic infection (NUCL) with positive parasitological diagnosis, it was also possible to identify three similar clinical-immunological profiles, that is: (1) indeterminate symptomatic infection (ISI), characterized by humoral immune response (ELISA: IgM+/IgG+), however, without detection of cellular immune response (DTH-) IgG+/IgM+/DTH-, IgG+/IgM-/DTH-, and IgG-/IgM+/DTH-; (2) resistant symptomatic infection (RSI), characterized by humoral (ELISA: IgM+/IgG+) and cellular (DTH+) immune responses IgG+/IgM+/DTH+, IgG+/IgM-/DTH+, and IgG-/IgM+/DTH+; and, (3) final symptomatic infection (FSI), also characterized only by cellular immune response (DTH+) IgG-/IgM-/DTH+. In addition to these three profiles, it was also possible to identify a fourth clinical-immunological profile: (4) early symptomatic infection (ESI), in which only the parasitological diagnosis was present, while humoral (ELISA: IgM-/IgG-) and cellular (DTH-) immune responses were not detected.

In summary, considering the three type of diagnostic tests used in this study, clinical, parasitological, and immunological (ELISA-IgG/IgM and DTH), it seems clear that, depending on the individual's immune response, that is, resistance or susceptibility, the infection can evolve to an asymptomatic resistance profile, as did most cases of the infection diagnosed here (75.5%; 320/424) without clinical signs of either NUCL or AVL, or to a symptomatic one, showing clinical signs of NUCL (24.5%; 104/424).

2.6. Polytomous Logistic Regression

Polytomous logistic regression showed that individuals who had a DTH+ test or combination with an early marker (DTH+/IgM+) had a greater chance of having characteristic NUCL lesions (DTH+ P = 0.001; DTH+/IgM+ P = 0.002). In both cases, the odds of NUCL were increased at least 2.8 times. This association between DTH+ and NUCL is an interesting feature of *L. (L.) infantum* infections in Central America. Nevertheless, individuals with only IgM+ test have 29% lower odds of NUCL

according to the polytomous logistic regression ($p < 0.007$, Table 5), and the odds are even smaller for cases that are only IgG+, with 88.3% lower odds of presenting NUCL ($p < 0.007$, Table 5). The combination IgG−/IgM−/DTH− was taken as the reference group. Other results for the polytomous logistic regression are shown in Table 6.

Table 6. Results of the multivariable polytomus logistic regression analysis.

Predictor	Outcome	Odds Ratio	Std. Err.	Z	P> z	[95% Conf. Interval]	
IgM−/IgG−/DTH−	NUCL −					Reference	
IgM+	NUCL +	0.866	0.295	−0.42	0.674	0.443	1.692
	NUCL −	0.710	0.089	−2.72	0.007	0.555	0.909
IgM+/IgG+	NUCL +	0.449	0.343	−1.05	0.295	0.100	2.009
	NUCL −	0.171	0.036	−8.32	0.000	0.112	0.259
IgG+	NUCL +	0.354	0.268	−1.37	0.171	0.080	1.566
	NUCL −	0.217	0.041	−7.95	0.000	0.149	0.316
IgG+/DTH+	NUCL +	0.835	0.480	−0.31	0.754	0.270	2.578
	NUCL −	0.184	0.037	−8.23	0.000	0.123	0.275
DTH+	NUCL +	2.834	0.857	3.45	0.001	1.567	5.127
	NUCL −	0.434	0.064	−5.66	0.000	0.325	0.579
IgM+/IgG+/DTH+	NUCL +	0.649	0.503	−0.56	0.578	0.142	2.966
	NUCL −	0.118	0.029	−8.56	0.000	0.072	0.193
IgM+/DTH+	NUCL +	2.852	0.985	3.03	0.002	1.448	5.614
	NUCL −	0.269	0.047	−7.45	0.000	0.191	0.380

3. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study about clinical-immunological profiles of the human *L. (L.) infantum*-infection spectrum in Mesoamerica. We combined clinical and parasitological examination as well as humoral (ELISA-IgM/IgG) and cellular (DTH skin test) immune response as parameters to understand the risk of individuals to get infection by *L. (L.) infantum* in an area where this pathogen is present [9,22,23].

Amapala municipality has several characteristics that enable human *L. (L.) infantum*-infection transmission [22,24]. For example, *Lutzomyia longipalpis* [25] and *Lutzomyia evansi* (Nuñez-Tovar), the two most important sand fly vector species in the region, are also the two most abundant species in tropical forests surrounding the study area [26]. These conditions for *L. (L.) infantum* endemicity are crucial to understand its clinical form prevalence patterns, since it has been suggested that a long-term exposure to *L. (L.) infantum*-infection may favor the development of some population level herd immunity, as reported in northeastern Brazil [17,19]. It has been shown that resistance against AVL could be controlled by a genetic mechanism related with the ability to mount an acquired immune response to *L. (L.) infantum*-infection as measured by the DTH⁺ phenotype associated with LECT2 and TGFBI genes [27,28]. Previous studies reported similar characteristics in NUCL patients from Honduras [22] and Nicaragua [8], describing positive DTH as the most relevant finding, 58% and 79%, respectively. Similar findings are reported in the present study that showed positive DTH reaction in both resistant clinical-immunological profiles, symptomatic (RSI and FSI) and asymptomatic (RAI and FAI), with rates of 55.7% and 32.4%, respectively (Table 5).

Regarding the gender distribution of human *L. (L.) infantum*-infections, no significant difference was found by sex ($P > 0.82$), as reported in preceding studies [17,22,29]; however, infections became more common as individuals aged. The macroscopic lesions were mostly unique, small (<5 mm), nodular, and not ulcerated with a hypopigmented halo, as previously described [8,22,30]. Lesions were mainly present in the extremities, followed by the thorax, with a time of evolution below 12 months.

Concerning the prevalence of infection in the study area, it is important to clarify that, considering the clinical criteria demonstrated by relevant participation in the diagnosis of symptomatic cases of infection (NUCL), since 100% of them were confirmed by parasitological examination, there is no doubt that the clinical parameter cannot be neglected when assessing the prevalence of infection, especially

in the clinically suspected NUCL cases. Therefore, the prevalence of infection was first estimated considering the symptomatic cases (NUCL) confirmed by the parasitological exam ($n = 104$), which generated a prevalence rate of 18%, and, in the second, considering the cases of asymptomatic infection confirmed by immunological tests (ELISA-IgM/IgG and DTH), which revealed an asymptomatic prevalence rate of 55.5%. Finally, considering the numbers of cases from symptomatic ($n = 104$) with those asymptomatic ($n = 320$), it then reached a total of 424 cases of infection or exposure, revealing an overall prevalence rate of 73.6%.

There is no doubt that this reflects a very interesting epidemiological situation for the following reasons: first, because it highlights the importance of clinical suspicion in assessing the prevalence of symptomatic infection, since 100% of suspected NUCL cases were confirmed by parasitological examination; second, if a projection of NUCL is made in the “Del Tigre” island population (~5000 individuals) based on the determined symptomatic infection prevalence rate (18%), it is possible to estimate the existence of approximately 900 NUCL cases on the island, which represents important information for the epidemiological surveillance secretary of the Health Department of Amapala municipality; and third, although the prevalence of asymptomatic infection (55.5%) does not reveal an estimate of the disease itself, this estimate is of great value for better understanding the magnitude of the epidemiological situation of infection in the study area, where the overall prevalence rate of infection, which resulted from the prevalence of symptomatic infection plus the asymptomatic one, reached a very high rate of 73.6%, indicating that almost three thirds (75%) of the population in the study area are exposed or infected by *L. (L.) infantum*.

The importance of DTH (cellular immunity) as a diagnostic tool for human infection by viscerotropic *Leishmania* species has undoubtedly been largely demonstrated not only in the New World [8,22,27,31–33] but also in the Old World [34–36]. However, as shown in Table 5, the use of ELISA-IgM/IgG serological test (humoral immunity) cannot be neglected as an important tool in the diagnosis of infection, since, comparing the two diagnostic tools in the present study, it was verified that, on the spectrum of asymptomatic infection, the serological diagnosis (ELISA-IgM/IgG) of cases from the IAI profile was confirmed in 35.4% of the cases, while the diagnosis by cellular immunity test (DTH) of the cases of the RAI and the FAI profiles was confirmed in 32.4% of the cases, showing that there was no difference between these rates ($P > 0.05$) and that the two types of immunity, humoral and cellular, seem to be strongly associated in the course of asymptomatic infection. It is interesting to note, however, that, on the spectrum of symptomatic infection (NUCL), it was observed that the diagnosis by cellular immunity test (DTH) of cases from RSI and FSI profiles showed positivity in 55.7% of these cases, which is significantly higher ($P < 0.05$) than the 19.2% positive diagnoses among the cases from ISI profile, suggesting that, unlike the course of asymptomatic infection, on the side of the symptomatic infection spectrum (NUCL), the cellular immunity overlapped the humoral one, which possibly may be interpreted as an attempt to play a protective role against infection.

These results seem to definitively demonstrate that the diagnostic approach to human *L. (L.) infantum*-infection as well as the immune responses of the infected individuals in an endemic area should not be individualized in just one of the investigation methods, DTH (cellular immunity) or ELISA-IgM/IgG (humoral immunity), due the magnitude of human’s immune responses repertory against infection. In this sense, it is important to emphasize that the diagnostic approach to infection used in the present study was based on a diagnostic approach protocol that also sought to contemplate the diagnosis of the two types of immune responses of infection, cellular and humoral, in the Brazilian Amazon [17–21], which provided, in the present study as well as in the Amazonian studies, a greater visibility of the clinical-immunological profiles of infection spectrum with the identification of seven clinical-immunological profiles, three on the side of the asymptomatic infection spectrum (IAI, RAI, and FAI), and four on the side of the symptomatic infection (NUCL) spectrum (ESI, ISI, RSI, and FSI).

Regarding the importance of these clinical-immunological profiles of human *L. (L.) infantum*-infection in the study area, defined by the association of the clinical status of the individuals examined (symptomatic and asymptomatic), parasitological examination, and immunological tests

(ELISA-IgM/IgG and DTH), it is worth mentioning that, among those on the side of the symptomatic infection (NUCL) spectrum, the clinical-immunological profile ESI mainly draws attention due to its clinically symptomatic infectious state confirmed by parasitological diagnosis, however, without detection of both humoral (ELISA-IgM/IgG) and cellular (DTH) immune responses. At first sight, this is a condition that seems to represent an early infectious state, reason that it was named early symptomatic infection; probably, there should not have been enough time for the parasitic load on the skin lesions of these patients to trigger an antigenic stimulus capable of promoting the full activation of humoral and/or cellular immune responses. In this sense, it is important to say that, in some NUCL cases observed in the present study, there were a very limited number of skin lesions (one or two only), papular in appearance (≤ 5 mm), and with a low parasitic load under microscopy, confirming the low parasitic load on the skin. Moreover, it is necessary to emphasize that this is a condition that seems unprecedented in the study of leishmaniasis, since, to date, no other clinical-immunological situation regarding human symptomatic *Leishmania*-infection is known that is not supported by humoral (ELISA-IgM/IgG) or cellular (DTH) immune responses. In this way, the other explanation for this unusual fact could be the result of an escape mechanism of the parasite to humoral and/or cellular immune responses, which has already been evidenced in the Brazilian Amazon, mainly with regard to cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (L.) amazonensis*, which uses this mechanism of escape from cellular immune response to promote the clinical forms borderline disseminated cutaneous leishmaniasis (LCDB) and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis (LCAD), which are associated with important cellular immune-suppression (negative DTH response) and poor therapeutic response for different schemes of treatment [37–39].

Another point that deserves to be highlighted regarding the ESI profile is its high frequency (25%) among the symptomatic infection profiles, being surpassed only by the frequency (30.8%) of the FSI profile, which denotes that, among the clinical-immunological profiles of symptomatic infection (NUCL), the ESI profile may also signal a state of adaptation of the parasite on the host skin, possibly seeking to produce an immune-inflammatory response of moderate intensity with the objective of using the host as a source of infection for the sand fly vector (*Lutzomyia longipalpis*). In this sense, there is already evidence obtained by our group pointing to the moderate presence of inflammatory response [13] as well as mediators of the immune-inflammatory response in the skin lesions of patients with NUCL [14].

In spite of the crucial role of host immunity in determining the human humoral and cellular immune responses against *Leishmania* parasite, the genetic diversity of strains could not be neglected. In this sense, it is important to mention that homogeneity among *L. (L.) infantum* strains isolated from human VL and NUCL in Honduras has been described [11]. In addition, recent microsatellite studies have shown low heterogeneity among *L. (L.) infantum* isolates from the New World and no correlation between *L. infantum* genotypes and clinical picture [40]. Despite the description of MON-1 and non-MON-1 populations on the Caribbean Coast of Central America, it is important to mention that our study area is on the Pacific Coast of Honduras, where has been described the presence of MON-1 population. Genome-wide global study showed little diversity among *L. infantum* samples; however, several hybrid lineages were reported with identical genetic groups varying in heterozygosity and levels of linkage [41], which could be related to different host responses to infection.

In the polytomous regression analysis, the presence or the absence of typical NUCL lesions was used as a response variable. Odd ratios were then estimated for different combinations of test results, and it was observed that coefficients for the group DTH⁺ ($P < 0.002$) and IgM⁺/DTH⁺ ($P < 0.001$) were the best predictors for having an NUCL lesion. These results help establish a possible interaction among exposure to *L. (L.) infantum*, the appearance of an early marker (IgM) and a resistance marker (DTH) in the development of immune protection in the inhabitants of the Pacific zone from Honduras. This represents the first report on clinical and immunological features of symptomatic and asymptomatic human *L. (L.) infantum*-infection in the municipality of Amapala, Pacific coast of Honduras.

4. Materials and Methods

4.1. Study Area

This study was carried out in Amapala municipality (N13° 15.618, W87° 37.463), Department of Valle, with an area of 80.7 km². The municipality comprises two islands, Zacate Grande and El Tigre, located in the Gulf of Fonseca in south-western Honduras. The municipality has a total of 28 villages with an estimated population of 13,302 individuals. The natural vegetation cover is dominated by a dry tropical forest. Temperature ranges between 25 °C and 35 °C, and average annual rainfall is 2096 mm. The dominant topography is mountainous and rugged with an average altitude of 44 m.

However, the highest point of the island is 760 meters with clay soil, marshes, and swamps [42]. The ecological landscape markedly changes between the dry season (November–May) and the rainy season (June–October). Housing characteristics in Amapala are homogeneous; most houses are made of adobe and/or wood with a tin roof and have electricity but lack sanitation. Most homes have at least one pet, with dogs being the most common pet [26,42].

4.2. Study Design

A cross-sectional study was designed to study the prevalence of human symptomatic and asymptomatic *L. (L.) infantum*-infection using clinical and parasitological diagnostics as well as humoral (ELISA-IgG/IgM) and cellular (DTH skin test) immune responses, respectively, which also were used to clarify the clinical-immunological profiles of the infection spectrum. In all cases, we used *L. (L.) infantum*-specific antigens [19,20,43]. To calculate the sample size, we used WinEpiscope statistical program [44], which estimated that the population involved in the study should consist of a cohort of approximately 586 subjects aged 1 year or older, assuming an infection rate of 50%, since there are no previous studies carried out in Central America. We were able to 576 individuals from 15 locations in the municipality of Amapala, Department of Valle, Honduras (Figure 2).

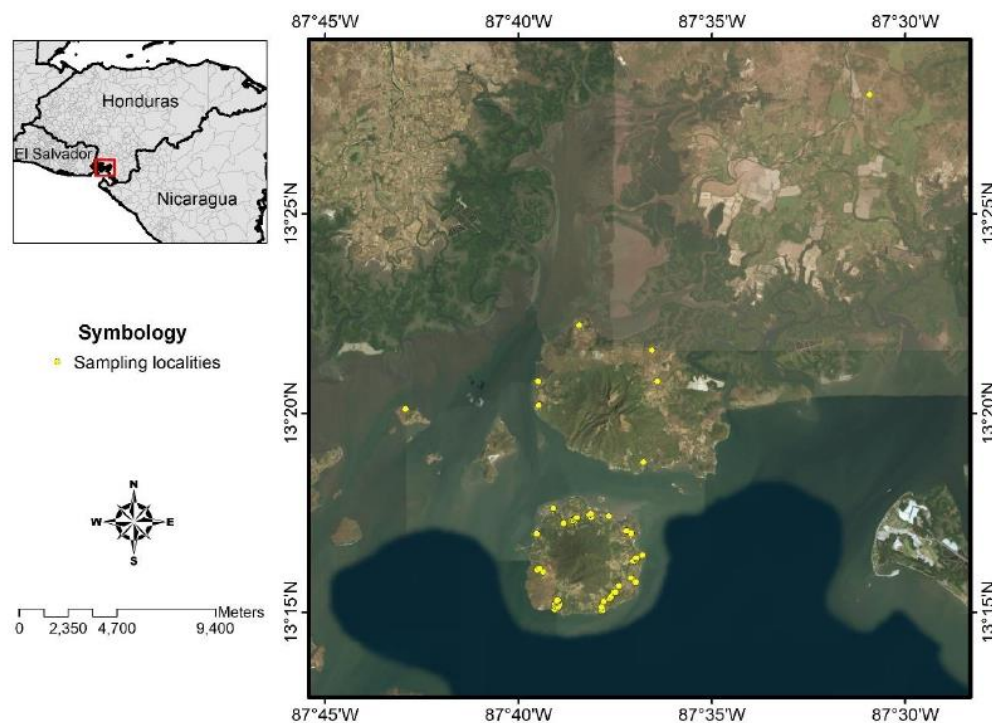


Figure 2. Study area, municipality of Amapala, Honduras. For details about the symbols, please refer to the inset legend.

4.3. Study Population

The individuals were invited to participate in the project in coordination with the Health Unit director of Amapala municipality. The sampling was done by active search, house by house, to aggregate a larger number of individuals. The study population consisted of 576 individuals, 336 females and 240 males older than one year. The population was divided into three groups according to age group: 1–10, 11–20, and ≥ 21 years.

The purpose of the study was presented to each individual, and only those who agreed to participate were included in the study by signing an informed consent form. The project was approved by the Ethics Committee of the Master Program in Infectious and Zoonotic Diseases of the School of Microbiology of the National Autonomous University of Honduras (protocol number 03-2014) and by the Research Ethics Committee of the School of Medicine of the University of São Paulo (CAAE protocol: 64223917.1.0000.0065).

4.4. Clinical Evaluation and Sample Collection

All enrolled subjects underwent a clinical evaluation. The clinical evaluation considered clinical signs suggestive of AVL and NUCL. Specifically, clinical signs included fever, liver and spleen enlargement, as well as papular or nodular skin lesions. Clinical and epidemiological data were recorded for each individual and used for further correlation with ELISA (IgM/IgG) and DTH findings. Individuals with skin lesions suspected of NUCL underwent direct parasitological examination using Giemsa-stained skin lesion scrapings and 100 \times objective light microscopy. Subsequently, the Montenegro skin test (DTH) was applied and whole blood collected, 5 mL, by venipuncture to obtain serum, which was aliquoted and stored at -70 °C until processing.

4.5. Montenegro Skin Test—Delayed Type Hypersensitivity (DTH)

Promastigote forms of *L. (L.) infantum* (MCAO/BR/2003/M22697) were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The parasites in stationary phase of growth in culture were washed and fixed in merthiolate solution (1/10,000) in the final concentration of 10^7 forms/mL and stored in 2 mL bottles in refrigerator. A volume of 0.1 mL of antigen suspension was intradermally administered to the forearm of each individual. After 48 hours, the intradermal reaction was evaluated, and the formation of a nodule greater than or equal to 5 mm in diameter was considered positive. Equal volume of 1/10,000 merthiolate solution without *Leishmania* antigen was intradermally administered to the contralateral forearm of each individual as negative control [17,19,20,43].

4.6. Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (ELISA)

ELISA was done according to Hirata and collaborators [45]. Polystyrene plates were sensitized with 100 μ L of crude *L. (L.) infantum* antigen (MHOM/HN/2017/AMA-73) at a concentration of 5 μ g/well diluted in carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6. The plates were incubated overnight at 4 °C. Following 3 washes with Tween-20 phosphate-buffered saline (PBS), nonspecific binding sites were blocked with 100 μ L 10% skim powdered milk solution in PBS for 1 hour at 37 °C in a humid chamber. After washing the plates, duplicate test sera and controls diluted 1:400 in Tween-20 PBS were added in the volume of 100 μ L per well. After incubation at 37 °C for 1 hour, the plates were washed again, and the anti-human IgG peroxide conjugate (Calbiochem) at dilution of 1:50,000 or the anti-human IgM peroxide conjugate (Calbiochem) at dilution of 1:20,000 was added in 100 μ L/well volume, and the plates were incubated at 37 °C for 45 minutes. After washing the plates, the reaction was finalized by the addition of 100 μ L/well of 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) substrate (B&D) and kept for 15 minutes at room temperature in a darkroom. The reaction was stopped with 50 μ L/well of 2N sulfuric acid, and the reading was performed on a spectrophotometer on a 450 nm filter. The observed absorbance values were corrected by subtracting the blank absorbance value. To establish the reaction cut-off line, the mean absorbance values obtained for negative control sera were increased

twice by their standard deviation. Samples with absorbance values lower than the reaction cut-off value were considered negative, and samples with values above the cut-off value were considered positive. Considering the optical density values of the positive control and the tests, the absorbance of the positive samples were converted to ELISA units according to Rodriguez-Cortez et al. [46]

4.7. Identification Criteria of Human *L. (L.) infantum*-Infection

The definition of human *L. (L.) infantum*-infection or exposure was determined by clinical examination, parasitological diagnosis, and the presence of reactivity in one or both immunoassays (ELISA-IgM/IgG and DTH).

4.8. Molecular Diagnosis and Characterization of *Leishmania* Parasite Species

A commercial kit (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, USA) was used for DNA extraction from blood samples following the manufacturer's instructions. DNA from skin lesion scrapes samples was extracted using Chelex 5% (Bio-Rad Lab Inc., Hercules, USA).

To identify the *Leishmania* genus, primers LEISH-1: 5'-AACTTTCTGGTCTCCGGGTAG-3' and LEISH-2: 5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3' were used that provided a kDNA product of 120 bp [47]. Amplifications were performed using a commercial kit (Master Mix 2X -Promega). Each reaction was performed by adding 4 µL of target DNA and 0.6 µmol/L of each primer in a final volume of 20 µL. The amplifications consisted of an initial denaturation cycle at 94 °C for 5 min. The second step of 40 cycles consisted of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 20 s, and extension at 72 °C for 1 min, followed by a final extension cycle at 72 °C for 10 min. Results were observed on a 2% agarose gel, previously subjected to a 100 V electrophoresis for 1 h.

In order to characterize *Leishmania* species, a PCR-RFLP targeting a fragment of 234 bp of Hsp70 gene was accomplished with primers Hsp70 sense (5' GGACGAGATCGAGCGCATGGT 3') and Hsp70 antisense (5' TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG 3') [48]. Amplifications were performed using a commercial kit (Master Mix 2X -Promega). Each reaction comprised 4 µL of sample DNA and 0.6 µmol/L of each primer in a final volume of 20 µL. The amplifications consisted of an initial denaturation cycle at 94 °C for 5 min. The second step consisted of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 59 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min for 37 cycles. The last step consisted of a final extension cycle at 72 °C for 10 min. Results were observed on a 2% agarose gel previously subjected to a 100 V electrophoresis for 1 h. To perform the restriction of PCR products, 15 µL of the amplified DNA were added to a tube reaction containing 1 µL (10 U) of *Hae* III enzyme (Promega), 2 µL of restriction enzyme 10X buffer, 0.2 µL of acetylated BSA at 10 µg/µL and 1.8 µL of deionized water, incubated at 37 °C for 3 h followed by 20 min incubation at 80 °C for the enzyme inactivation. The species profiles of each sample and reference controls were observed in a 4% agarose gel subjected to electrophoresis for 3.5 h.

4.9. Data Analysis

The data were analyzed using Stata statistical package V.12.0 (StataCorp, 2011. College Station, TX: StataCorp LP) and WinEpiscope 2.0. The Chi-Square Test of Independence was used to test for significant differences in infection between sex and age of symptomatic and asymptomatic groups with a 5% significance level. The Kruskal–Wallis test was used to estimate the median difference among the time of disease progression (months) and the number of skin lesions. We also performed a polytomous logistic regression to understand how the positivity of one or a combination of diagnostic tests was associated with NUCL as a clinical outcome [49].

5. Conclusions

The combination of clinical, parasitological, and immunological (ELISA-IgM/IgG and DTH) parameters allowed us to estimate *L. (L.) infantum* prevalence and to characterize the clinical-immunological profiles of its infection spectrum at Amapala municipality in Honduras.

We found that skin symptomatic infections, called non-ulcerated or atypical cutaneous leishmaniasis, were associated with a positive DTH response and, to a lesser extent, with IgM/IgG production.

Author Contributions: Conceptualization, M.D.L., F.T.S., C.E.P.C. and C.Z.; methodology, W.S.-O., G.V.A.F., C.M.S.P. and V.L.R.d.M.; formal analysis, M.D.L., F.T.S., W.S.-O., C.Z. and L.F.C.; writing—original draft preparation, M.D.L., F.T.S., W.S.-O. and L.F.C.; project administration, M.D.L., W.S.-O. and C.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by São Paulo Research Foundation #2016/50315-0 and Scientific Research Office of the UNAH (DICU-UNAH), Honduras #02-2015. Wilfredo Sosa-Ochoa is supported by PhD Scholarship from CAPES, Brazil. Marcia Laurenti is a research fellow from National Research Council, CNPq, Brazil.

Acknowledgments: We thank the Ministry of Health of Honduras for allowing and assisting in the work in the endemic area and Thaise Yumie Tomokane and Jessica Cardenas for perfect technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO. *Control of the Leishmaniasis: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2010; Volume 949.
2. Pearson, R.D.; Sousa, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* **1996**, *22*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Silveira, F.T.; Lainson, R.; de Souza, A.A.A.; Crescente, J.A.B.; Corbett, C.E.P. Leishmaniose visceral americana. In *Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia*, 1st ed.; Leão, R., Ed.; Samauma: Belém, PA, Brasil, 2013; Volume 2, pp. 1245–1274.
4. Silveira, F.T.; Lima, L.V.d.R.; Santos, T.V.d.; Ramos, P.K.S.; Campos, M.B. Revendo a trajetória da leishmaniose visceral americana na Amazônia, Brasil: De Evandro Chagas aos dias atuais. *Rev. Pan Amaz. Saúde* **2016**, *7*, 15–22. [[CrossRef](#)]
5. Costa, D.L.; Rocha, R.L.; Carvalho, R.M.; Lima-Neto, A.S.; Harhay, M.O.; Costa, C.H.; Barral-Neto, M.; Barral, A.P. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog. Glob. Health* **2013**, *107*, 78–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Gama, M.E.A.; Gomes, C.M.d.C.; Silveira, F.T.; Laurenti, M.D.; Goncalves, E.d.G.; Silva, A.R.d.; Corbett, C.E.P. Severe visceral leishmaniasis in children: The relationship between cytokine patterns and clinical features. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2013**, *46*, 741–745. [[CrossRef](#)]
7. Neva, F.A.; Ponce, C.; Ponce, E.; Kreutzer, R.; Modabber, F.; Olliaro, P. Non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras fails to respond to topical paromomycin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1997**, *91*, 473–475. [[CrossRef](#)]
8. Belli, A.; Garcia, D.; Palacios, X.; Rodriguez, B.; Valle, S.; Videa, E.; Tinoco, E.; Marin, F.; Harris, E. Widespread atypical cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania* (L.) *Chagasi* in Nicaragua. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *61*, 380–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Campos-Ponce, M.; Ponce, C.; Ponce, E.; Maingon, R. *Leishmania chagasi*/infantum: Further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. *Exp. Parasitol.* **2005**, *109*, 209–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. 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. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *99*, 13–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Noyes, H.; Chance, M.; Ponce, C.; Ponce, E.; Maingon, R. *Leishmania chagasi*: Genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. *Exp. Parasitol.* **1997**, *85*, 264–273. [[CrossRef](#)]
12. Matute, N.; Espinoza, C.; Alger, J.; Padgett, D.; López, E.; Zúniga, C. Caracterización clínico-epidemiológica de pacientes con Leishmaniasis atendidos en el Hospital Escuela. *Rev. Med. Hondur.* **2009**, *77*, 7–15.
13. Sandoval Pacheco, C.M.; Araujo Flores, G.V.; Favero Ferreira, A.; Sosa Ochoa, W.; Ribeiro da Matta, V.L.; Zuniga Valeriano, C.; Pereira Corbett, C.E.; Dalastra Laurenti, M. Histopathological features of skin lesions in patients affected by non-ulcerated or atypical cutaneous leishmaniasis in Honduras, Central America. *Int. J. Exp. Pathol.* **2018**, *99*, 249–257. [[CrossRef](#)]

14. Araujo Flores, G.V.; Sandoval Pacheco, C.M.; Tomokane, T.Y.; Sosa Ochoa, W.; Zuniga Valeriano, C.; Castro Gomes, C.M.; Corbett, C.E.P.; Laurenti, M.D. Evaluation of Regulatory Immune Response in Skin Lesions of Patients Affected by Nonulcerated or Atypical Cutaneous Leishmaniasis in Honduras, Central America. *Mediat. Inflamm.* **2018**, *2018*, 3487591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Santos, K.E.; Bermúdez, J.; Lutz, E.L.; Alger, J.; Sierra, M.; Fajardo, D. Estudio clínico-epidemiológico de leishmaniasis cutánea atípica en Reitoca, zona endémica del sur de Honduras. *Rev. Médica Post Grados Med. UNAH* **2006**, *9*, 48.
16. Castro, G.A.L.; Ponce, C.; Ponce, E.; Sierra, M. Caracterización de pacientes con leishmaniasis cutánea atípica. *Medicine* **2008**, *76*, 101–107.
17. Crescente, J.A.; Silveira, F.T.; Lainson, R.; Gomes, C.M.; Laurenti, M.D.; Corbett, C.E. A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *103*, 1250–1256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lima, L.V.d.R.; Ramos, P.K.S.; Campos, M.B.; Santos, T.V.d.; Gomes, C.M.d.C.; Laurenti, M.D.; Corbett, C.E.P.; Silveira, F.T. Preclinical diagnosis of American visceral leishmaniasis during early onset of human *Leishmania (L.) infantum chagasi*-infection. *Pathog. Glob. Health* **2014**, *108*, 381–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Silveira, F.T.; Lainson, R.; Crescente, J.A.; de Souza, A.A.; Campos, M.B.; Gomes, C.M.; Laurenti, M.D.; Corbett, C.E. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *104*, 529–535. [[CrossRef](#)]
20. Silveira, F.T.; Lainson, R.; De Souza, A.A.A.; Campos, M.B.; Carneiro, L.A.; Lima, L.V.R.; Ramos, P.K.S.; de Castro Gomes, C.M.; Laurenti, M.D.; Corbett, C.E.P. Further evidences on a new diagnostic approach for monitoring human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil. *Parasitol. Res.* **2010**, *106*, 377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Lima, L.; Vasconcelos-Dos-Santos, T.; Campos, M.; Ramos, P.K.; Gomes, C.; Laurenti, M.; da Matta, V.; Corbett, C.; Silveira, F. New record of preclinical diagnosis of American visceral leishmaniasis in Amazonian Brazil encourages optimizing disease control. *Parasite Epidemiol. Control* **2020**, *10*, e00154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ponce, C.; Ponce, E.; Morrison, A.; Cruz, A.; Kreutzer, R.; McMahon-Pratt, D.; Neva, F. *Leishmania donovani chagasi*: New clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Lancet* **1991**, *337*, 67–70. [[CrossRef](#)]
23. Navin, T.R.; Sierra, M.; Custodio, R.; Steurer, F.; Porter, C.H.; Ruebush, T.K., 2nd. Epidemiologic study of visceral leishmaniasis in Honduras, 1975–1983. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1985**, *34*, 1069–1075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Carrasco, J.; Morrison, A.; Ponce, C. Behaviour of *Lutzomyia longipalpis* in an area of southern Honduras endemic for visceral/atypical cutaneous leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1998**, *92*, 869–876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lutz, A.; Neiva, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1912**, *4*, 84–95. [[CrossRef](#)]
26. Mejia, A.; Matamoros, G.; Fontecha, G.; Sosa-Ochoa, W. Bionomic aspects of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis*, proven vectors of *Leishmania infantum* in an endemic area of non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 15. [[CrossRef](#)]
27. Jeronimo, S.M.; Holst, A.K.; Jamieson, S.E.; Francis, R.; Martins, D.R.; Bezerra, F.L.; Ettinger, N.A.; Nascimento, E.T.; Monteiro, G.R.; Lacerda, H.G.; et al. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. *Genes Immun.* **2007**, *8*, 539–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Jeronimo, S.M.; Duggal, P.; Ettinger, N.A.; Nascimento, E.T.; Monteiro, G.R.; Cabral, A.P.; Pontes, N.N.; Lacerda, H.G.; Queiroz, P.V.; Gomes, C.E.; et al. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: A genomewide scan. *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, 1261–1269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Nascimento, M.d.D.S.B.; Souza, E.C.; Silva, L.M.d.; Leal, P.d.C.; Cantanhede, K.d.L.; Bezerra, G.F.d.B.; Viana, G.M.d.C. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermorreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Pública* **2005**, *21*, 1801–1807. [[CrossRef](#)]

30. Zeledon, R.; Macaya, G.; Ponce, C.; Chaves, F.; Murillo, J.; Bonilla, J.A. Cutaneous leishmaniasis in Honduras, Central America. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1982**, *76*, 276–277. [[CrossRef](#)]
31. Badaro, R.; Jones, T.C.; Lorencio, R.; Cerf, B.J.; Sampaio, D.; Carvalho, E.M.; Rocha, H.; Teixeira, R.; Johnson, W.D., Jr. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J. Infect. Dis.* **1986**, *154*, 639–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Badaro, R.; Jones, T.C.; Carvalho, E.M.; Sampaio, D.; Reed, S.G.; Barral, A.; Teixeira, R.; Johnson, W.D., Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **1986**, *154*, 1003–1011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jeronimo, S.M.; Teixeira, M.J.; Sousa, A.; Thielking, P.; Pearson, R.D.; Evans, T.G. Natural history of *Leishmania* (Leishmania) *chagasi* infection in Northeastern Brazil: Long-term follow-up. *Clin. Infect. Dis.* **2000**, *30*, 608–609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pampiglione, S.; La Placa, M.; Schlick, G. Studies on mediterranean Leishmaniasis. I. An outbreak of visceral leishmaniasis in Northern Italy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1974**, *68*, 349–359. [[CrossRef](#)]
35. Pampiglione, S.; Manson-Bahr, P.E.; La Placa, M.; Borgatti, M.A.; Musumeci, S. Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1975**, *69*, 60–68. [[CrossRef](#)]
36. Moral, L.; Rubio, E.; Moya, M. A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacanti region (Spain): Implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *96*, 129–132. [[CrossRef](#)]
37. Campos, M.B.; do Rego Lima, L.V.; de Lima, A.C.S.; dos Santos, T.V.; Ramos, P.K.S.; de Castro Gomes, C.M.; Silveira, F.T. Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* and *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*. *PLoS ONE* **2018**, *13*. [[CrossRef](#)]
38. Silveira, F.T. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *113*, 505–516. [[CrossRef](#)]
39. Silveira, F.T.; Muller, S.F.R.; Laurenti, M.D. Leishmaniose Tegumentar Americana. In *Tratado de Dermatología*, 3rd ed.; Belda, W., Jr., Di Chiacchio, N., Criado, P.R., Eds.; Atheneu: São Paulo, Brazil, 2018; pp. 1691–1700.
40. Kuhls, K.; Alam, M.Z.; Cupolillo, E.; Ferreira, G.E.M.; Mauricio, I.L.; Oddone, R.; Feliciangeli, M.D.; Wirth, T.; Miles, M.A.; Schönian, G. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Franssen, S.U.; Durrant, C.; Stark, O.; Moser, B.; Downing, T.; Imamura, H.; Dujardin, J.C.; Sanders, M.J.; Mauricio, I.; Miles, M.A.; et al. Global genome diversity of the *Leishmania donovani* complex. *eLife* **2020**, *9*. [[CrossRef](#)]
42. Sosa-Ochoa, W.; Morales Cortedano, X.; Argüello, A.; Zuniga, C.; Henríquez, J.; Mejía, R.; Mejía, A.; Araujo, G.; Sandoval, C.; Quan, D. Ecoepidemiología de la Leishmaniasis cutánea no ulcerada en Honduras. *Rev. Cienc. Tecnol. UNAH* **2014**, *14*, 115–128. [[CrossRef](#)]
43. Silveira, F.T.; Lainson, R.; Pereira, E.A.; de Souza, A.A.; Campos, M.B.; Chagas, E.J.; Gomes, C.M.; Laurenti, M.D.; Corbett, C.E. A longitudinal study on the transmission dynamics of human *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil, with special reference to its prevalence and incidence. *Parasitol. Res.* **2009**, *104*, 559–567. [[CrossRef](#)]
44. Thrusfield, M. *Veterinary Epidemiology*; Blackwell Science: Hoboken, NJ, USA, 2007.
45. Hirata, K.Y.; Oliveira Sobrinho, E.B.; Rigon, L.; Utsunomiya, Y.T.; Tomokane, T.Y.; Laurenti, M.D.; Marcondes, M. Exposure to *Leishmania* spp. infection and *Lutzomyia* spp. in individuals living in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2019**, *53*, e20190320. [[CrossRef](#)]
46. Rodríguez-Cortés, A.; Ojeda, A.; López-Fuertes, L.; Timón, M.; Altet, L.; Solano-Gallego, L.; Sánchez-Robert, E.; Francino, O.; Alberola, J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int. J. Parasitol.* **2007**, *37*, 683–693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Francino, O.; Altet, L.; Sanchez-Robert, E.; Rodriguez, A.; Solano-Gallego, L.; Alberola, J.; Ferrer, L.; Sanchez, A.; Roura, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* **2006**, *137*, 214–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. Graca, G.C.; Volpini, A.C.; Romero, G.A.; Oliveira Neto, M.P.; Hueb, M.; Porrozzi, R.; Boite, M.C.; Cupolillo, E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2012**, *107*, 664–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Kleinbaum, D.G.; Klein, M. Polytomous logistic regression. In *Logistic Regression*; Springer: Berlin, Germany, 2010; pp. 429–462.




© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

SHORT REPORT

Open Access



Detection of *Leishmania infantum* DNA in *Pintomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis* in Honduras

Wilfredo Sosa-Ochoa^{1,5*} , Javier Varela Amador², Yokomi Lozano-Sardaneta³, Gabriela Rodriguez Segura¹, Concepcion Zúniga Valeriano⁴, Gabriela Venicia Araujo⁵, Carmen María Sandoval Pacheco⁵, Márcia Dalstra Laurent⁵ and Fredy Galvis-Ovallos⁶

Abstract

Background: The two most abundant sand fly species on the Honduran Pacific coast are *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* and *Pintomyia (Pifanomyia) evansi*. Both species are known vectors of *Leishmania (Leishmania) infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis (VL) in the Americas. Although VL and non-ulcerative cutaneous leishmaniasis (NUCL) are endemic on the Pacific versant of the Central American Pacific, the latter is the most frequent manifestation of leishmaniasis there. We evaluated the circulation of *Leishmania* spp. in the sand fly species on El Tigre Island, an endemic area of NUCL.

Results: We collected 222 specimens of six sand fly species. *Lu. longipalpis* (180 specimens; 81%) and *Pif. (Pi.) evansi* (35 specimens; 16%) were the most abundant species. *L. (L.) infantum* DNA was detected in nine of the 96 specimens analyzed; seven of these specimens were identified as *Lu. longipalpis*, and the remaining two were *Pi. evansi*, with an infection rate of 9.4% and 2.7%, respectively.

Conclusion: We present the first record of *L. (L.) infantum* DNA in *Pi. evansi* from a NUCL endemic region of Central America. Our results suggest that *Pi. evansi* could be a secondary vector of *L. (L.) infantum* in the transmission cycle of leishmaniasis. The detection of natural infections of *L. (L.) infantum* in sand flies in this region contributes to an understanding of the epidemiology of leishmaniasis in Honduras.

Keywords: *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Pintomyia (Pifanomyia) evansi*, *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, Visceral leishmaniasis, Non-ulcerative cutaneous leishmaniasis

Background

Leishmaniasis is a vector-borne parasitic disease caused by species of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Leishmania* is widespread mainly in tropical and subtropical regions of 98 countries throughout Europe, Africa, Asia, and America [1]. More than 1,000 sand fly species have been identified worldwide,

of which 530 species are present in the Americas [2, 3], and at least 30 species are considered *Leishmania* vectors [4]. In Honduras, 29 sand fly species have been reported [2, 5–7]. Members of the *Lutzomyia longipalpis* species complex are the main vectors of *Leishmania (Leishmania) infantum*; however, other sand fly species, including *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* and *Pintomyia (Pifanomyia) evansi*, play a role as vectors of this parasite in some endemic areas of visceral leishmaniasis (VL) in South and Central America [8, 9]. *Lu. longipalpis* s.l. is the most abundant sand fly species in the area endemic for VL and non-ulcerative cutaneous leishmaniasis

*Correspondence: wilfredo.sosa@unah.edu.hn

¹ Microbiology Research Institute, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Tegucigalpa, Honduras

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

(NUCL) in the southern region of Honduras [6, 10], and is the only species reported as a vector of *L. (L.) infantum* [11]. Nevertheless, the role of *Pi. evansi* in VL transmission dynamics in Honduras is unknown, although evidence of its vector competence has been reported in South America [12]. For this reason, the aim of this study was to evaluate the DNA circulation of *L. (L.) infantum* in *Lu. longipalpis* and *Pi. (Pif.) evansi* on a Mesoamerican Pacific island.

Methods

Study area and sand fly collection

This study was carried out in Amapala municipality (13°17'26.082"N, 87°39'5.543"W), Valle department, an area covering 80.7 km². The municipality comprises two islands, Zacate Grande and El Tigre, located in the Gulf of Fonseca in southern Honduras. Sand flies were sampled for five consecutive nights in May 2018 from five localities: Las Pelonas (13°16'58.332"N, 87°37'4.799"W), Punta Honda (13°16'21.576"N, 87°36'56.879"W), Tigüilotada (13°15'45.720"N, 87°36'57.527"W), Islitas (13°15'39.456"N, 87°37'24.276"W) and Playa Grande (13°16'4.183"N, 87°39'31.104"W). The captures were carried out from 6:00 p.m. until 6:00 a.m., using automatic CDC miniature light traps (model 512; John W. Hock, Gainesville, FL) in neighborhoods where active cases of NUCL were evident. The traps were installed in peridomestic environments, near decomposing organic matter or next to latrines. The specimens were separated and processed 1 day after capture.

Taxonomic identification of the sand fly species

The taxonomy of the phlebotomine sand flies was conducted by analyzing their morphological characteristics. In adherence to the identification procedures outlined by Mejía et al. [6], the sand flies were first mounted and the specific species identified in accordance with Young and Duncan [5]. Finally, Galati et al. [13] were the primary academic resource used during the classification stage of the genera and the species.

Genomic material extraction and polymerase chain reaction

Genomic DNA was extracted from gut tissues dissected from individual female sand flies using the Chelex 100 Kit (Bio-Rad, Hercules, CA). As an internal control for the DNA extraction, the cacophony *IVS6* gene present in the sand fly genome was amplified [14]. For the detection of the genus *Leishmania*, we used the primers Leish1: 5'-AACTTTTCTCTGGTCCCTCCGGGTAG-3' and Leish2: 5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3' to amplify

an approximate 120-base pair (bp) product [15]. Amplifications were performed using a commercial kit (Master Mix 2X; Promega). Each reaction was performed by adding 4 µl of target DNA and 0.6 µmol/L of each primer to obtain a final volume of 20 µl. The polymerase chain reaction (PCR) reactions were done in an Applied Biosystem 2770 Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, USA), under the following conditions: initial denaturation cycle at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 15 s, 60 °C for 20 s and 72 °C for 60 s, and final extension at 72 °C for 10 min. The amplification products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gel.

To characterize the *Leishmania* species, PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) was performed, which amplified a specific region of the *hsp70* gene [16]. The primers used were *hsp70* sense (5' GGACGAGATCGAGCGCATGGT 3') and *hsp70* antisense (5' TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG 3'). The reaction mixture was prepared in a final volume of 20 µl with 10 µl Master Mix 2X (Promega), 4 µl of target DNA and 0.6 µmol/L of each primer. The PCR reactions were done under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 37 cycles at 94 °C for 30 s, 61 °C for 1 min and 72 °C for 3 min, and a final extension cycle at 72 °C for 10 min. The amplification products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel. To perform the restriction of the PCR products, the restriction enzyme *HaeIII* (Promega) was used, 5 µl of amplified DNA was added to the reaction and the mixture incubated at 37 °C for 3 h. The species profiles of each sample and reference controls were observed in 4% of agarose gel subjected to electrophoresis for 3.5 h.

Results and discussion

A total of 222 sand fly specimens were collected, which were predominately males (66%) (Table 1). Six species were identified by using morphological characters. The most predominant sand fly species collected was *Lu. (Lu.) longipalpis*, followed by *Pi. (Pif.) evansi*. The other species that were captured included *Micropygomyia (Micropygomyia) cayennensis cayennensis*, *Micropygomyia (Coquillettomyia) chiapanensis*, *Dampfomyia (Coromyia) beltrani* and *Lutzomyia (Tricholateralis) gomezi*. *Lu. (Lu.) longipalpis* has been previously studied in the region and was incriminated as the vector of *L. (L.) infantum* [11]. The behavioral characteristics of this species in the study area were described by Carrasco et al. [7]. Recently, Mejía et al. [6] expounded on various aspects of sand flies' feeding preferences within the Pacific Honduran area. These authors observed a predominance of *Pi. (Pif.) evansi* and *Lu. (Lu.) longipalpis*, but did not detect the presence of *L. (L.) infantum* in these species [6]. These sand flies were also predominant in other NUCL-endemic areas of Central America (i.e., Costa Rica and Nicaragua) [17, 18]

Table 1 Sand fly species captured, by locality, and detection of *Leishmania* spp. and *Leishmania (Leishmania) infantum*

Locality (sand flies; n)	Species	Males (n)	Females (n)	%	Specimens with <i>Leishmania</i> spp. DNA (n) (%)	Females with <i>L. (L.) infantum</i> DNA (n) (%)
Playa Grande (175)	<i>Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis</i>	95	35	79.2	26 (35.13)	7 (9.45)
	<i>Pintomyia (Pifanomyia) evansi</i>	10	24	20.8	11 (14.8)	2 (2.70)
Las Pelonas (16)	<i>Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis</i>	12	2	87.5	–	–
	<i>Micropygomyia (Micropygomyia) cayennensis cayennensis</i>	1	1	12.5	–	–
Punta Honda (29)	<i>Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis</i>	24	4	96.5	–	–
	<i>Micropygomyia (Coquillettomyia) chiapanensis</i>	0	1	3.5	–	–
Islitas (13)	<i>Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis</i>	6	2	61.5	–	–
	<i>Dampfomyia (Coromyia) beltrani</i>	0	2	15.4	–	–
	<i>Pintomyia (Pifanomyia) evansi</i>	0	1	7.7	–	–
	<i>Micropygomyia (Micropygomyia) cayennensis cayennensis</i>	0	1	7.7	–	–
	<i>Lutzomyia (Tricholateralis) gomezi</i>	0	1	7.7	–	–

Thirty-seven of the 96 analyzed female specimens were positive for the genus *Leishmania* according to the PCR results (Fig. 1). *L. (L.) infantum* DNA was revealed in nine specimens: seven *Lu. (Lu.) longipalpis* and two *Pi. (Pif.) evansi*. The *L. (L.) infantum* infection rate was 9.4% for *Lu. (Lu.) longipalpis* and 2.7% for *Pi. (Pif.) evansi*. All of the samples analyzed produced an amplified product of 220 bp, corresponding to a *Lutzomyia* spp. constitutive gene (cacophony), which confirmed the integrity of the insect DNA preparation and the absence of PCR inhibitors [14]. We used a method for the detection of *Leishmania* spp. described in Francino et al. [15]. However, one limitation of this method is the small size of the PCR product (120 bp), which makes sequencing unlikely. Therefore, the method described by Graça et al. [16] was used to differentiate *Leishmania* species. This method amplifies a *Leishmania* 234-bp *hsp70* fragment and shows similar sensitivity to the PCR-internal transcribed spacer 1 (>70%) method used to detect *Leishmania* DNA;

however, associating this 234-bp *hsp70* with a RFLP protocol may give researchers the advantage of being able to distinguish this *Leishmania* species by electrophoresis [19].

Our study is the first to report the presence of *L. (L.) infantum* DNA in *Pi. evansi* females in Central America. In two studies in Colombia, in endemic areas of VL, the natural infection rate of *L. (L.) infantum* in *Pi. evansi* was found to be 0.10% [12] and 0.34% [19]. The natural infection rates of *Lu. longipalpis* were between 0.5% and 1.1% according to direct observations of dissected intestines [11, 20] and from PCR of dissected intestines [21–23]. We report a 9.4% infection rate of *L. (L.) infantum* in *Lu. longipalpis*, which is in agreement with other research [22, 23]. Although the detection of *Leishmania* DNA in sand flies does not indicate the ability of these species to transmit this parasite, we evidenced contact between *Pi. evansi* and *Lu. longipalpis* with the natural host of *L. (L.) infantum* in the study area, in the Amapala municipality.

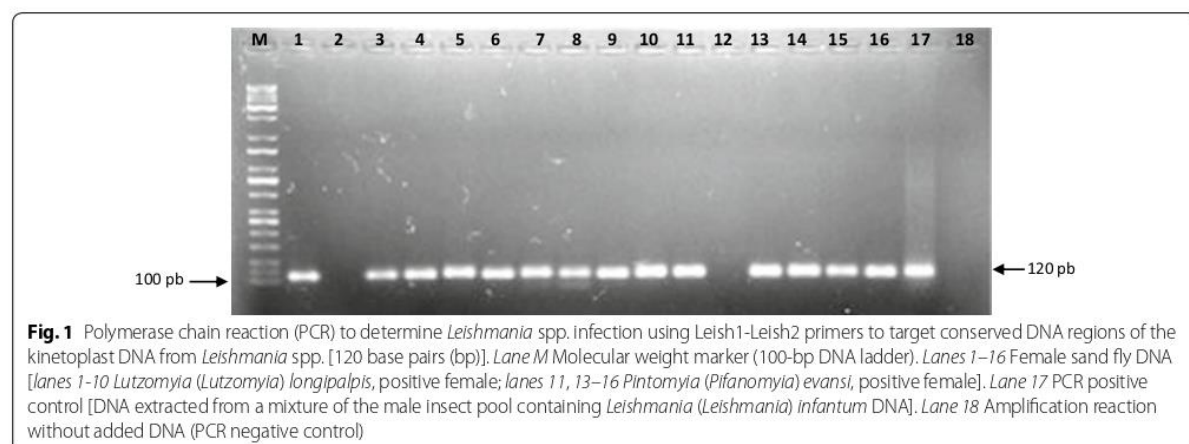


Fig. 1 Polymerase chain reaction (PCR) to determine *Leishmania* spp. infection using Leish1-Leish2 primers to target conserved DNA regions of the kinetoplast DNA from *Leishmania* spp. [120 base pairs (bp)]. Lane M Molecular weight marker (100-bp DNA ladder). Lanes 1–16 Female sand fly DNA [lanes 1–10 *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, positive female; lanes 11, 13–16 *Pintomyia (Pifanomyia) evansi*, positive female]. Lane 17 PCR positive control [DNA extracted from a mixture of the male insect pool containing *Leishmania (Leishmania) infantum* DNA]. Lane 18 Amplification reaction without added DNA (PCR negative control)

Considering that the vector competence of *Pi. evansi* has been previously described [12], it is probable that both *Lu. longipalpis* and *Pi. evansi* transmit *L. (L.) infantum* in southern Honduras.

Conclusion

We present for the first time evidence of the presence of *L. (L.) infantum* DNA in *Pi. evansi* in a NUCL endemic region of Central America. Considering the natural infection of *Lu. longipalpis* by *L. (L.) infantum*, our results indicate that *Pi. evansi* might be a secondary vector of this parasite, and might be involved in the transmission cycle of leishmaniasis. The detection of natural infections of *L. (L.) infantum* in sand flies in this region contributes to our understanding of the epidemiology of leishmaniasis in Honduras.

Abbreviations

VL: Visceral leishmaniasis; NUCL: Non-ulcerative cutaneous leishmaniasis; PCR: Polymerase chain reaction; bp: Base pairs; RFLP: Restriction fragment length polymorphism.

Acknowledgements

We thank the Ministry of Health of Honduras for allowing us to further our research in the NUCL endemic area of Amapala municipality and for assisting us in this endeavor. We would also like to thank Jessica Cardenas for her outstanding technical support.

Authors' contributions

Conceptualization: MDL, FG, and WSO. Methodology: WSO, FG, JV, YL, GVA, CMSP, CZ, and GS. Formal analysis: WSO, FG, and MDL. Preparation of the first draft: WSO, FG, and MDL. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was financially supported by the Research Directorate of the National Autonomous University of Honduras.

Availability of data and materials

Data supporting the conclusions of this article are included within the article. Specimens of *Lutzomyia* analyzed during the study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Microbiology Research Institute, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Tegucigalpa, Honduras. ² Hospital Militar de Honduras, Tegucigalpa, Honduras. ³ Centro de Medicina Tropical, División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. ⁴ Health Surveillance Department, University School Hospital, Tegucigalpa, Honduras. ⁵ Laboratory of Pathology of Infectious Diseases, Medical School, São Paulo University, São Paulo, SP, Brazil. ⁶ Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Received: 17 June 2020 Accepted: 5 November 2020

Published online: 23 November 2020

References

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*. 2012;7:e35671.
- Shimabukuro PHF, De Andrade AJ, Galati EAB. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *ZooKeys*. 2017;660:67–106.
- Galati EAB, Galvis-Ovallos F, Lawyer P, Léger N, Depaquit J. An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Parasite*. 2017;24:26.
- Beati L, Caceres AG, Lee JA, Munsternann LE. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol*. 2004;34(2):225–34.
- Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville. *Mem Am Entomol Inst*. 1994;54:1–881.
- Mejía A, Matamoros G, Fontecha G, Sosa-Ochoa W. Bionomic aspects of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis*, proven vectors of *Leishmania infantum* in an endemic area of non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Parasites Vectors*. 2018;11(1):15.
- Carrasco J, Morrison A, Ponce C. Behaviour of *Lutzomyia longipalpis* in an area of southern Honduras endemic for visceral/atypical cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*. 1998;92(8):869–76.
- Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(8):811–27.
- Chaves LF, Anez N. Nestedness patterns of sand fly (Diptera: Psychodidae) species in a Neotropical semi-arid environment. *Acta Trop*. 2016;153:7–13.
- Sosa-Ochoa W, Morales Cortedano X, Argüello A, Zuniga C, Henríquez J, Mejía R, et al. Ecoepidemiología de la Leishmaniasis cutánea no ulcerada en Honduras. *Rev Cienc Tecnol UNAH*. 2014;14:115–28.
- Ponce C, Ponce E, Morrison A, Cruz A, Kreutzer R, McMahon-Pratt D, et al. *Leishmania donovani chagasi*: new clinal variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Lancet*. 1991;337(8733):67–70.
- Travi BL, Vélez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, Montoya J. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1990;84(5):676–7.
- Galati EAB. Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas. Vol I. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 2019. https://www.fsp.usp.br/egalt/wpcontent/uploads/2020/02/Apostila_Vol_I_2019.pdf. Accessed 18 May 2019.
- Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(4):593–5.
- Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodríguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2006;137:214–21.
- Graça GC, Volpini AC, Romero GAS, Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzini R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:664–74.
- Zeledón R, Murillo J, Gutiérrez H. Observaciones sobre la ecología de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) y posibilidades de existencia de leishmaniasis visceral en Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984;79(4):455–9.
- Raymond RW, McHugh CP, Kerr SF. Sand flies of Nicaragua: a checklist and reports of new collections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(7):889–94.
- Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramillo C, Llano R, Vélez ID. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Colombia. *J Med Entomol*. 1996;33(3):278–85.
- Silva JGD, Werneck GL, Cruz MSP, Costa CHN, Mendonça IL. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí Brasil. *Cad Saúde Públ*. 2007;23(7):1715–20.

21. Flórez M, Martínez JP, Gutiérrez R, Luna KP, Serrano VH, Ferro C, et al. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) en un foco suburbano de leishmaniosis visceral en el Cañón del Chicamocha en Santander Colombia. *Biomédica*. 2006;26(Supl1):109–20.
22. Michalsky EM, Guedes KS, França-Silva JC, Dias CLF, Barata RA, Dias ES. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(1):58–62.
23. Mota TF, de Sousa OMF, Silva YJ, Borja LS, Leite BMM, Solcà MDS, et al. Natural infection by *Leishmania infantum* in the *Lutzomyia longipalpis*

population of an endemic coastal area to visceral leishmaniasis in Brazil is not associated with bioclimatic factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;13:e0007626.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

