



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

KEREN BASTOS VALEZI

**Epidemiologia genética em leishmaniose visceral:
Estudo de associação com a população de Bauru-SP**

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Ana Carla Pereira Latini

**Botucatu
2017**

Keren Bastos Valezi

Epidemiologia genética em leishmaniose visceral:
Estudo de associação com a população de Bauru
– SP.

Dissertação de mestrado
apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em
Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof(a).Dr(a).Ana Carla Pereira Latini

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Valezi, Keren Bastos.

Epidemiologia genética em leishmaniose visceral : estudo de associação com a população de Bauru-SP / Keren Bastos Valezi. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Ana Carla Pereira Latini
Capes: 20205007

1. Leishmaniose visceral - Epidemiologia. 2. Endemias.
3. Polimorfismo (Genética). 4. Bauru (SP).

Palavras-chave: Epidemiologia genética; *IL10*; Leishmaniose visceral; *NOD2*; *TLR1*.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

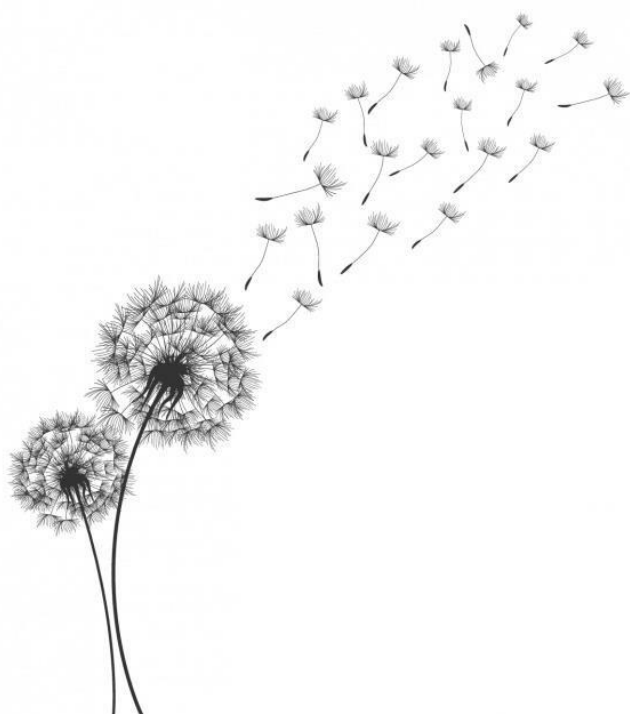


Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por ter me dado força neste caminho, por me dar sabedoria em frente as dificuldades e por ter me guiado nos momentos mais difíceis.

Dedico este trabalho especialmente aos meus pais, Elizeu e Marta Valezi, e as minhas irmãs, Pâmela e Melissa. Por todo o apoio, por toda dedicação. Por acreditarem em mim durante todos esses anos, pelo imensurável amor e cuidado. Tudo o que eu alcancei hoje é graças a vocês.

Dedico este trabalho para os pacientes deste estudo. Obrigada pela confiança e por terem me ajudado a alcançar este objetivo.



Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ana Carla Pereira Latini, pela confiança e por todo o conhecimento que tem me proporcionado nesses últimos anos. Sou muito grata pela oportunidade, pelo aprendizado, por todo o momento que passamos juntos por essa caminhada. Obrigada pelos conselhos, pelos puxões de orelha que me amadureceram e me ajudaram na minha formação profissional. Obrigada por toda a compreensão e carinho. Deixo aqui minha admiração e o meu mais sincero obrigada.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) onde realizei o meu trabalho de mestrado. Agradeço a todos que participaram deste trabalho e que me ajudaram de alguma forma.

Aos pesquisadores do Instituto Lauro de Souza Lima, Vânia, Carolina, Elaine, Suzana, Eliane, Ida Maria, Dejair, Renata, Sônia e Maria Renata que contribuíram com sugestões, conselhos e com amizade.

À Priscila Ballalai, pelo companheirismo, por ter sido minha mão direita dentro do laboratório. Por ter sido meu exemplo aqui dentro. Pelos conselhos, por ser sempre tão solícita e pelo companheirismo.

À minha amiga-irmã Mariane, pelo companheirismo, pela amizade e pelos conselhos. Por todo o apoio que você me deu durante esses anos, por ter se tornado uma pessoa tão especial, por ter se tornado minha irmã. O meu mais sincero obrigada por tudo. À Elderson Valois, pelas conversas científicas, pelos cafés no fim de tarde e pelas dicas no laboratório. Mas principalmente por sua amizade. Deus coloca pessoas na nossa vida para amarmos e cuidarmos.

À Amanda e Eloíse, obrigada por terem me guiado dentro do laboratório, por terem me ajudado sempre que precisei. Obrigada pela amizade, por terem transformado o laboratório em um lugar inesquecível para mim. Obrigada pelas risadas, e por nossas reuniões! Aos meus companheiros de laboratório Gislaine, Priscila, Rafaela, Dayana, Gabriela, Bruna, Giovanna e Rodrigo, obrigada pelos bons momentos, pela contribuição de vocês, pela amizade e por estarem presente durante esta etapa.

Para toda à Equipe Técnica de Patologia do Instituto Lauro de Souza Lima. Gostaria de agradecer a *Nelci, Osmar, Fabiana e Cláudia* pelo corte dos blocos das biópsias. À *Caroline e Clara* por pacientemente me ensinarem a extração de DNA dos blocos de biópsia.

À Equipe do Hospital Estadual de Bauru, Kelly Ribeiro de Moura pela disponibilização dos blocos de biópsias. À José Cláudio Simão, por ter me ajudado na seleção dos pacientes. À Rosilene Cordeiro por ter nos ajudado nas burocracias. O meu sincero agradecimento a vocês.

Ao Instituto Adolf Lutz, principalmente Virginia Bodelão Richini e a Kethelyn Magliani por ter disponibilizado as amostras de sangue. Obrigada pela contribuição!

Aos Prof. (s) Dr. (s) Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza e Vania Nieto de Souza Brito pela contribuição e participação no Exame Geral de Qualificação.

Agradecimentos Institucionais

À Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu pelo suporte técnico, especialmente a Bruna Quirino Jorgetto pelo apoio.

Aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Doenças Tropicais pelo suporte técnico e acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima, onde este trabalho foi desenvolvido e a todos os profissionais que de alguma forma auxiliaram durante sua realização.

Lista de abreviações

- HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana.
- IFAT** – *Immunofluorescence antibody test.*
- IHA** – *Indirect haemagglutination test.*
- ELISA** – Ensaio Imunoenzimático
- PCR** – Reação da cadeia polimerase
- NASBA** – *Nucleic acid sequence based amplification.*
- LAMP** – *Loop-mediated isothermal amplification method.*
- rRNA** – RNA ribossômico
- DNA** – Ácido dextrorribonucléico
- RNA** – Ácido ribonucleico
- OMS** – Organização mundial da saúde
- BCG** – *Bacillus Calmette-Guérin*
- PAMPs** – Padrões moleculares associados ao patógeno
- NOD-2** – *nucleotide binding oligomerization domain containing 2*
- NLR** – Receptores do tipo Nod
- PRRs** – Receptores de reconhecimento padrão
- TLR** – Receptores do tipo Toll
- TNF** – Fator de necrose tumoral
- LPG** – Lipofosfoglicano
- NFK- β** – Fator nuclear *kappa B*
- IL** - Interleucina
- MPO** – Myeloperoxidase
- IFN** – Interferon gama
- NETs** – *Neutrophil extracellular traps*
- MHC** – Complexo principal de histocompatibilidade
- Th** – Linfócitos T helper
- TCD4+** - Linfócitos T CD4
- TGF** – Fator de transformação de crescimento
- GM-CSF** – *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

LPS – Lipopolissacarídeo

GP63 – Metaloproteinase

TDT – Teste de Desequilíbrio de Transmissão

SSTR – *Small tandem repeats*

VTNR – *Variable number of tandem repeats*

SNP – Polimorfismo de base única

GWAS – *Genome Wide Association Study*

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

Resumo

A leishmaniose é uma doença antroponóptica causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*. Ele apresenta três formas clínicas, conhecidas como leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea. A leishmaniose visceral afeta dois milhões de indivíduos anualmente no mundo. Os fatores genéticos envolvidos na interação hospedeiro-parasita foram associados ao desfecho clínico da doença. Este estudo investigou pela primeira vez a associação de polimorfismos nos genes candidatos *IL10*, *NOD2* e *TLR1* com leishmaniose visceral na população brasileira. Para isso, escolhemos três marcadores anteriormente associados a infecções causadas por parasitas intracelulares na população brasileira. Nós genotificamos 135 pacientes e 380 controles saudáveis. A presença do alelo G do rs4833095 no gene *TLR1* foi fortemente associada à susceptibilidade a esta doença: análise do alelo G (OR 2.04; IC 1.22-3.39; p-value 0.0061); Análise do genótipo GG (OR 3,87; 95%IC 1,85-8,08, p-valor 0,0003); Análise de portadores de G (OR 2,5; 95%IC 1,33-5,00; valor p 0,0047). Para o gene *NOD2*, também encontramos uma associação para o genótipo AA (OR 2.07 95%IC 1.05-4.05, p-value 0.0335) do polimorfismo rs8057341. Finalmente, poderíamos confirmar a associação do marcador rs1800871 na região promotora do gene *IL10* com susceptibilidade à leishmaniose visceral, para o genótipo TT (OR 2,34; 95%IC 1,11-4,94 p-value 0,0245).

Conclusão. Nossos dados demonstram pela primeira vez a associação desses genes candidatos com leishmaniose visceral na população brasileira, colocando esses marcadores como candidatos fortes na composição de futuros painéis genéticos para prever o risco de infecções na população brasileira e para estudos de meta-análise em visceral leishmaniose.

Abstract

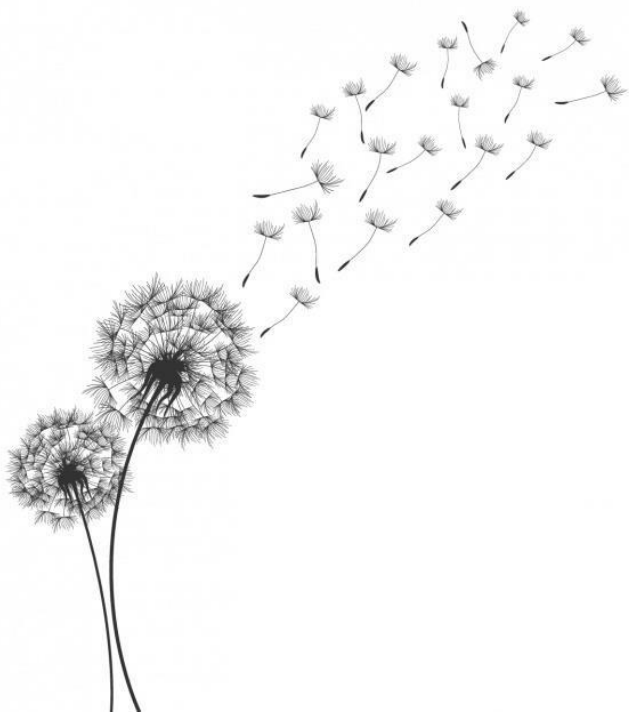
Leishmaniasis is an antropozoonotic disease caused by the protozoan of the genus *Leishmania*. It presents three clinical forms, known as visceral leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis and mucocutaneous leishmaniasis. Visceral leishmaniasis affects two million individuals annually in the worldwide. Genetic factors involved in the host-parasite interplay have been associated with the clinical outcome of the disease. This study investigated for the first time the association of polymorphisms at the candidate genes *IL10*, *NOD2* and *TLR1* with visceral leishmaniasis in Brazilian population. For that, we have chosen three markers previously associated to infections caused by intracellular parasites in Brazilian population. We have genotyped 135 patients and 380 healthy controls. The presence of G allele of the rs4833095 at *TLR1* gene was strongly associated with susceptibility to this disease: G allele analysis (OR 2.04; CI 1.22-3.39; p-value 0.0061); GG genotype analysis (OR 3.87; IC95 1.85-8.08; p-value 0.0003); G carriers analysis (OR 2.5; CI95 1.33-5.00; p-value 0.0047). For *NOD2* gene we also found an association for AA genotype (OR 2.07 IC95 1.05- 4.05; p-value 0.0335) of the polymorphism rs8057341. Finally, we could confirmed the association of marker rs1800871 in the promoter region of the *IL10* gene with susceptibility to visceral leishmaniasis, for TT genotype (OR 2.34; CI95 1.11-4.94 p-value 0.0245) **Conclusion.** Our data demonstrate for the first time the association of these candidate genes with visceral leishmaniasis in Brazilian population, placing these markers as strong candidates in the composition of future genetic panels to predict risk of infections in Brazilian population, and for meta-analysis studies in visceral leishmaniasis.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Aspectos gerais.....	01
1.2 Agente etiológico das leishmanioses	02
1.3 Patógeno e ciclo evolutivo	03
1.4 Leishmaniose visceral americana.....	04
1.5 Sintomatologia e diagnóstico.....	06
1.6 Tratamento.....	08
1.7 Imunologia	10
1.7.1 Imunologia Inata... ..	10
1.7.2 Imunologia Adaptativa.....	11
1.8 Mecanismos de evasão do parasita... ..	14
1.9 Susceptibilidade genética em doenças infecciosas... ..	14
1.10 Genética humana na leishmaniose visceral americana	16
1.11 Escolha dos genes candidatos... ..	19
1. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos gerais	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
2. MANUSCRITO SUBMETIDO AO JOURNAL OF INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION	22
1. BACKGROUND.....	25
2. METHODS.....	27

2.1 Subjects and study design.....	27
2.1 SNPs selection	19
2.3 DNA extraction and SNP genotyping.....	28
2.4 Statical analysis.....	;
3. RESULTS.....	29
3.1 Allele G of the rs4833095 at <i>TLR1</i> is associated with susceptibility to visceral leishmaniasis in Brazilian patients	29
3.2 AA genotype of the rs8057341 at <i>NOD2</i> gene is associated with susceptibility to visceral leishmaniasis in Brazilian patients	29
3.3 TT genotype of rs1800871 at <i>IL10</i> Is associated with susceptibility to visceral leishmaniasis in Brazilian patients	30
4. DISCUSSION	30
ACKNOWLEDGE.....	33
REFERENCES	34
TABLES.....	42
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

Referencial Teórico



1. Introdução

1.1 Aspectos gerais.

As leishmanioses são antropozoonoses que fazem parte do grupo das doenças negligenciadas. São causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania spp*, transmitidos através da picada do inseto vetor flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*¹. São doenças de importância na saúde pública pela diversidade de sintomas clínicos que apresentam, com aumento dos números de casos na última década devido a co-infecção por HIV, afetando áreas antes livres da doença e reativação de focos endêmicos².

As leishmanioses são prevalentes em cerca de 100 países, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões vivendo em áreas de risco². Aproximadamente 2 milhões de novos casos ocorrem anualmente, e apenas 600.000 deste total são reportados². As leishmanioses são classificadas como leishmaniose visceral americana, leishmaniose tegumentar americana e leishmaniose mucocutânea. Cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral são concentrados em países como Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão enquanto que cerca de um milhão de casos de leishmaniose tegumentar ocorrem principalmente no Paquistão, Peru, Arábia Saudita, Tunísia e Brasil¹. Estes países são considerados focos endêmicos para as

leishmanioses principalmente devido as condições socioeconômicas, pouco investimento nas estratégias para eliminação dos vetores, condições socioambientais, tratamentos e ausência de testes sensíveis e específicos para a detecção da leishmania³.

A doença possui dois ciclos: o ciclo selvagem que envolve animais silvestres como raposas (*Vetulus pseudalopex*) e gambás (*Didelphis albiventris*), e o ciclo doméstico, que inclui o cão (*Canis familiaris*)⁴. Estas três espécies são consideradas reservatórios dos agentes etiológicos das leishmanioses, e o homem se torna hospedeiro acidental ao se envolver em locais denominados de focos zoonóticos, principalmente em áreas de riscos⁵.

1.2 Agente etiológico das leishmanioses

Existem mais de 400 espécies do inseto vetor *Lutzomyia*, e cerca de 40 destas já foram associados a transmissão das leishmanioses^{3,6}. O principal vetor da leishmaniose visceral americana é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*⁷ que transmite o agente etiológico *Leishmania infantum*^{8,9}, encontrado principalmente na América Latina⁶. No entanto, outras espécies já foram identificadas como possíveis vetores e reservatórios de *L. infantum*, como o *Lutzomyia cruzi*, *Lutzomyia evansi*, *Lutzomyia forattini* e *Lutzomyia migonei*, porém, dados mais robustos são necessários para a comprovação do envolvimento destes com a transmissão da doença¹⁰⁻¹³.

Os protozoários causadores da leishmaniose visceral americana possuem ampla distribuição geográfica, e são pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* que inclui a *Leishmania donovani* (Sudão, Etiópia, Índia, Ásia e África) e *Leishmania infantum* (Mediterrâneo e América do Sul)¹⁴.

Na América do Sul, a etiologia desta doença era atribuída a *Leishmania infantum* e a *Leishmania chagasi*. Muitos autores acreditavam que os primeiros casos de leishmaniose visceral no continente americano eram atribuídos a *Leishmania chagasi*, encontrada em animais silvestres, enquanto a *Leishmania infantum*, agente causador da doença no Velho Mundo, teria sido introduzida nas américas com a colonização espanhola e portuguesa¹⁴. Estudos posteriores de biologia molecular comprovaram similaridade na sequência genômica entre estas espécies e recomendaram a revisão da taxonomia de *Leishmania chagasi*, propondo que esta seja considerada como subespécie da *Leishmania infantum*, ou ainda a mesma espécie¹⁴.

A leishmaniose tegumentar é causada pelos protozoários *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensi*¹² transmitidos por espécies de flebotomíneos como *Lutzomyia withmani*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia intermedia*¹⁵⁻¹⁷.

1.3 Patógeno e ciclo evolutivo.

A *Leishmania sp.*, é um parasita intracelular presente principalmente em áreas tropicais e subtropicais, apresentando duas formas morfológicas e fisiológicas: forma amastigota, variando entre 3 a 5 μm , encontrada no hospedeiro mamífero e responsável pelas formas clínicas da doença; forma promastigota que tem cerca de 5 a 15 μm , e é encontrada no hospedeiro invertebrado¹⁸. O período de incubação no homem é bastante variável, de 10 dias a 24 meses¹⁹.

O ciclo se inicia com a inoculação das formas amastigotas, pelo inseto durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado. No inseto, o pH elevado e a temperatura favorecem a mudança das formas amastigotas em promastigotas procíclicas com flagelo²⁰. Estas migram até o intestino alcançando a válvula estomodal, uma junção entre o intestino e o canal alimentar, e se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas apresentando um flagelo curto, podendo escapar do lúmen do intestino. Estas formas então migram para o intestino anterior, onde a colonização do estômago e glândulas será essencial para a transmissão efetiva²⁰.

Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero, o inseto regurgita as formas promastigotas metacíclicas, que são fagocitadas pelas células de defesa na pele²¹. Uma vez nos fagolisossomos dos macrófagos, as formas promastigotas se diferenciam em formas amastigotas infectantes e sua propagação para outros macrófagos ocorre após a lise da célula hospedeira, podendo então haver disseminação para linfonodos e fígado²². As formas amastigotas internalizadas podem persistir intracelularmente e ser reativadas anos após a primeira infecção²³.

1.4 Leishmaniose visceral americana.

A leishmaniose visceral americana é a forma mais grave da doença, e apresenta uma taxa de fatalidade de 90% quando não tratada corretamente, sendo considerada a segunda maior causa de morte por parasitoses⁵.

Segundo a OMS, mais do que 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão e Sudão do Sul¹. Anualmente, ocorrem 50.000 a 90.000 novos casos mundiais, e o número global de mortes por esta doença varia de 20.000 a 50.000 por ano. O Brasil apresentou um total de 92.225 casos nos anos de 1990 a 2016, com 3.955 óbitos no período de 2000 a 2016¹. As faixas etárias mais atingidas são crianças com menos de 15 anos e idosos acima de 60 anos²⁴ associada à má nutrição e habitações precárias, que favorece a adaptação do *Lutzomyia longipalpis* no ambiente²⁵.

Cerca de 40 espécies do gênero *Lutzomyia* eram comumente encontrados em áreas rurais nos anos 80²⁶. Essas condições favoreceram o aumento da doença no Brasil, que hoje é responsável por 90% dos casos de leishmaniose visceral americana em toda a América Latina²⁷.

Os primeiros casos no Brasil ocorreram nos anos 80 em cidades do Nordeste e em algumas regiões do Pará e Minas Gerais, principalmente nas áreas rurais²⁸. A doença avançou para o Norte, Centro-Oeste e Sudeste devido à imigração dos moradores das áreas rurais para a urbana nos últimos 30 anos³.

Atualmente, a leishmaniose visceral americana ocorre em 21 estados brasileiros, distribuídos nas cinco regiões do Brasil³. No estado de São Paulo, a incidência dos casos aumentou devido ao fluxo de pessoas e mercadorias pela rodovia Noroeste, que liga este estado ao Mato Grosso do Sul²⁹.

Vale ressaltar que Marzocchi et al. 2009 sugeriram que a cidade do Rio de Janeiro também é um possível centro de transmissão para o Estado de São Paulo através do Vale do Paraíba, que tem um clima favorável à sobrevivência do *Lutzomyia spp.*

Outra hipótese é que a transmissão nesses estados tenha ocorrido através da rodovia Presidente Dutra e da Estrada de Ferro Central do Brasil, por conectarem Rio de Janeiro e São Paulo³⁰.

Os primeiros casos de São Paulo foram importados de outras regiões brasileiras em 1998, porém, os primeiros casos autóctones surgiram em Araçatuba em 1999. Foi registrada a detecção do *Lutzomyia longipalpis* na zona urbana em 1997, seguido da detecção dos casos caninos em 1998 e o primeiro caso humano em 1999³¹. Ocorreu então a expansão para os municípios de Marília, Presidente Prudente, Bauru e São José do Rio Preto²⁸.

Entre os anos de 1999 e 2013, foram notificados 2.324 casos de leishmaniose visceral americana, com uma prevalência de 2,8 casos por 100 mil habitantes e 200 óbitos no estado de São Paulo, concentrados em cinco regiões de saúde com 80 municípios afetados³². Entre 2010 e 2015 ocorreram 954 casos humanos e 81 mortes por leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo³³.

A cidade de Bauru é considerada uma das cidades mais endêmicas do interior de São Paulo, com a primeira transmissão antroponóptica em 2002³⁴. As cidades de Araçatuba e Bauru se tornaram o epicentro da disseminação de leishmaniose visceral americana pelo Estado de São Paulo, por serem centros regionais com grande fluxo de pessoas ligadas ao trânsito da rodovia Marechal Rondon, reforçando a importância da cidade na expansão da doença para outras regiões e para estudos epidemiológicos^{19,32}.

O aumento da transmissão da leishmaniose visceral americana acompanhou a expansão demográfica da microrregião de Bauru. Apesar do controle e prevenção realizados pela vigilância epidemiológica, diversos fatores têm sido descritos que favorecem a sobrevivência do flebotomíneo na cidade de Bauru, como clima variável, umidade relativa e a precipitação pluviométrica³⁵.

Outra situação que favorece o agravamento da doença na cidade de Bauru é o tempo médio de 28 dias entre o diagnóstico da doença e a introdução do medicamento³⁴. Segundo Anversa et al. 2015, no período de 2004 a 2012, que foram os anos considerados com maiores índices epidemiológicos da doença em Bauru, 381 casos ocorreram na cidade, e 31 óbitos¹⁹.

No triênio de 2013 a 2015 foram registrados 79 casos³⁴. A maior prevalência foi no gênero masculino e em crianças menores de 10 anos, principalmente devido à má nutrição, tornando-os mais propensos a desenvolver infecções¹⁹.

A maioria dos casos ocorreram em indivíduos que moram em bairros com condições sanitárias precárias e pouco acesso ao sistema de saúde¹⁹.

As co-infecções foram frequentes entre os casos de leishmaniose visceral americana da região de Bauru no período de 2003 a 2012, sendo que 9,1% apresentavam co-infecção pelo HIV¹⁹.

1.5 Sintomatologia e diagnóstico.

Após a inoculação do parasita no hospedeiro, a doença pode ser inicialmente assintomática, podendo progredir para a leishmaniose tegumentar acometendo a pele e as mucosas, ou para a leishmaniose visceral americana com comprometimento de órgãos⁵.

Os desfechos clínicos dependem da espécie do protozoário e da resposta do hospedeiro¹. A leishmaniose visceral americana apresenta sintomas mais graves onde os parasitas infectam macrófagos no fígado, baço, linfonodos e intestino. Uma fração dos casos tratados pode resultar na leishmaniose dérmica pós-calazar, com formação de máculas, pápulas e nódulos pelo tronco, braços e face³⁶⁻³⁸.

A suspeição clínica inicial da leishmaniose visceral americana ocorre quando o paciente apresenta sintomas como esplenomegalia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatias, anemias, perda de peso e febre⁵. Exames laboratoriais também podem auxiliar no diagnóstico, pois os pacientes comumente apresentam trombocitopenia, leucopenia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia. Outros sintomas já foram descritos, como neuropatias periféricas com biópsias de nervo apresentando degeneração axônica e desmielinização³⁹. A variabilidade de sintomas clínicos que as leishmanioses apresentam dificulta um diagnóstico diferencial e, conseqüentemente, a introdução de uma terapia mais adequada. Devido a essa variabilidade, muitas vezes os sintomas são confundidos com Doença de Chagas e Hanseníase⁴⁰.

O padrão ouro no diagnóstico laboratorial das leishmanioses é a demonstração do parasita em espécimes clínicos para a visualização das formas amastigotas em aspirados de linfonodos e medula óssea, biópsia de fígado ou sangue periférico^{41,42}.

Métodos de imunodiagnóstico também estão disponíveis como a imunofluorescência indireta (IFAT) e o ensaio de hemaglutinação indireta (IHA)⁴³. Dentre estes, o teste de ELISA é o mais utilizado, com uso de antígenos recombinantes rk39 e rkL08 da leishmania, e apresenta alta sensibilidade e especificidade^{40,44}.

Técnicas moleculares para a detecção de ácidos nucleicos do parasita têm se tornado ferramentas complementares importantes no diagnóstico laboratorial das leishmanioses. Métodos de nexted-PCR e PCR quantitativo já estão sendo aplicados na rotina como um complemento as outras técnicas^{29,45}.

Outras técnicas moleculares como o NASBA (*nucleic acid sequence-based assay*), que é baseado na detecção da região 18S rRNA da leishmania, e LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) também têm sido utilizadas para a detecção do DNA ou RNA da leishmania^{29,46}.

O risco dos pacientes com HIV desenvolverem leishmaniose aumenta 2.300 vezes em áreas endêmicas⁴⁷. Nessa casuística, observa-se maior incidência em pessoas de sexo masculino, na faixa etária entre 29 e 49 anos⁴⁸. As apresentações clínicas de pacientes com leishmaniose visceral americana co-infectados com HIV pouco diferem dos pacientes que apresentam apenas a leishmaniose visceral americana, facilitando o diagnóstico⁴⁸. No entanto, pacientes co-infectados com HIV podem apresentar alterações nos rins e no trato gastrointestinal, o que pode dificultar o uso da terapia específica e aumentar a mortalidade por leishmaniose entre estes pacientes⁴⁹. Com frequência estes pacientes também apresentam infecções oportunistas como toxoplasmose e criptococose⁵⁰.

A presença destes patógenos na mesma célula hospedeira (macrófago) tem grande efeito na função macrofágica e na multiplicação de ambos⁵¹, onde a leishmania induz a replicação do HIV-1, e o vírus media a replicação parasitária⁴⁷. A co-infecção por HIV nos pacientes com leishmaniose visceral americana tem sido reportada em mais de 25 países desde os anos 80, com 35% dos casos ocorrendo na Etiópia e no Sudão^{52,53}.

Na América Latina, o Brasil é o país que apresenta o maior número de casos de leishmaniose visceral americana com co-infecção por HIV, aumentando de 0,7% em 2001 para 8,5% em 2012^{48,54}.

Entre 2001 e 2011, 272 mortes por esta co-infecção foram registradas no Brasil⁵⁵. O aumento desta co-infecção tem sido associado com a migração de pessoas infectadas por HIV para áreas rurais com maior prevalência de leishmaniose visceral americana^{56,57}.

Testes sorológicos para leishmaniose apresentam menor acurácia em indivíduos infectados por HIV^{57,58}, e testes moleculares são mais indicados nestes casos por detectar diretamente o DNA do parasita. Porém, estes não são viáveis em países mais pobres, devido ao alto custo, tornando-se necessário os procedimentos mais invasivos como aspirado de medula óssea⁴⁷.

1.6 Tratamento.

Há poucas drogas disponíveis para o tratamento das leishmanioses. O tratamento é prologando e leva a cura, porém, apresenta elevada toxicidade⁶⁶ e alto custo. A OMS prevê investimento de US\$ 100 milhões por ano neste tratamento entre 2015 e 2030¹.

Os antimoniais pentavalentes stiboglucanato de sódio e antimoniato de N-metil glucamina são utilizados como primeira escolha no tratamento da leishmaniose visceral americana, embora os mecanismos de ação ainda não sejam completamente entendidos e seu uso seja contraindicado em casos de pacientes com doenças graves, maiores de 45 anos e pacientes co-infectados com HIV⁵⁹. A administração desse medicamento é intravenosa, e devido sua alta toxicidade, é necessário a internação do paciente⁵⁹. Além disso, casos de resistência medicamentosa já têm sido descritos para essas drogas⁶⁰. Assim, o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento desta doença vêm se tornando um objetivo da ciência.

A anfotericina B convencional e suas formulações lipídicas vêm sendo usadas como segunda escolha no tratamento das leishmanioses, exibindo taxa de cura de 90 a 95%⁶⁰. É indicada nos casos de toxicidade ou resposta insatisfatória aos antimoniais, e é a primeira escolha para tratar pacientes grávidas e casos terminais⁴⁷.

Formulações da anfotericina B, como o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal, apresentaram menor toxicidade quando aplicadas em baixas doses^{60,61}. A combinação da anfotericina B lipossomal com o miltefosine para o tratamento em pacientes co-infectados com HIV foi eficaz, podendo ser uma opção de tratamento⁶². No Brasil, o Ministério da Saúde limitou o uso da anfotericina B lipossomal para crianças, idosos, pacientes com co-infecção por HIV e pacientes com problemas renais, hepáticos ou cardíacos, por apresentarem maior risco de mortalidade⁶³.

A imunodeficiência causada pelo HIV aumenta a toxicidade às drogas em casos de co-infecção, ocasionando alta taxa de mortalidade. O Ministério da Saúde revisou guias terapêuticos em 2013 e recomendou que para os pacientes com HIV seja utilizado anfotericina lipossomal, que apresenta taxa de cura de 90%^{47,62}.

A fim de reduzir toxicidade e evitar resistência, associações de drogas têm sido testadas. Uma combinação entre estibogluconato de sódio e paramomicina mostrou eficácia no tratamento de pacientes com leishmaniose visceral americana na Índia^{62,64}. As associações entre miltefosina e anfotericina B e miltefosina e paramomicina também foram testadas em pacientes indianos, mas sem evidências quanto à eficácia⁶⁴.

Um estudo clínico de fase três foi conduzido no Sudão e no Kenya para verificar a eficácia das combinações anfotericina B e stiboglucanato de sódio, e anfotericina B e miltefosina. A taxa de cura nestes pacientes foi de 87% para a primeira combinação, e de 77% para a segunda⁶⁵. Um regime de 17 dias utilizando stiboglucanato de sódio em combinação com paramomicina demonstrou eficácia de 91% no tratamento para a leishmaniose visceral americana, sendo recomendado como tratamento de primeira escolha em países como Sudão, Kenya, Uganda, Etiópia e Somália⁶⁶.

Uma proposta promissora é o desenvolvimento de vacinas terapêuticas com o objetivo de melhorar a resposta imunológica dos indivíduos já infectados pela leishmania. A combinação de cepas autoclavadas de *L. major* com BCG e estiboglucanato de sódio foi testada em pacientes com leishmaniose dérmica pós-calazar, e demonstrou eficiência na cura de lesões, com aumento na produção de IFN- γ ⁶⁷.

1.7 Imunologia

1.7.1 Imunidade Inata

O estabelecimento de uma infecção com progressão para a doença é dependente de vários fatores como a cepa do parasita, características do vetor e a resposta imunológica do hospedeiro⁶⁸.

A resposta imunológica do hospedeiro se inicia com o reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (*PAMPS – pathogen associated molecular patterns*) pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores do tipo *toll like* (TLRs), e os receptores do tipo NOD (*nod-like receptors*) presentes nas células dendríticas e macrófagos⁶⁹. Na leishmaniose, receptores TLR2, TLR3, TLR7 e TLR9 interagem com moléculas expressas na superfície do parasita ativando a resposta inflamatória e controle do parasita pela resposta imune inata^{70, 71}. A interação do LPG (lipofosfoglicano) com o TLR2 induz a produção de TNF, IL-12 e espécies reativas do oxigênio, ocasionando uma resposta imune protetiva e a eliminação da leishmania nos macrófagos infectados^{71,72}.

A família dos receptores NOD-like (NLR) é composta por NOD-1 e NOD-2. O NOD-2 (*nucleotide binding oligomerization domain containing 2*) é responsável por controlar a imunidade contra patógenos intracelulares e extracelulares, podendo expressos em células dendríticas e outras células fagocitárias. Este receptor induz a ativação do NF- κ B (*nuclear factor-kappa*) que estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6 e IL-23 e induz a diferenciação para o perfil de resposta Th17^{73,74}.

Os neutrófilos são as primeiras células de defesa do hospedeiro a migrarem para o sítio de infecção e atuam no reconhecimento do patógeno, fagocitando as formas promastigotas inoculadas e causando a morte do parasita intracelular^{75,76}.

Após a fagocitose ocorre a fusão do fagossomo com os grânulos intracelulares dos neutrófilos, formando o fagolisossomo. O parasita é então exposto a enzimas hidrolíticas, peptídeos antimicrobianos e espécies reativas do oxigênio⁷⁷.

Os grânulos também possuem componentes citotóxicos, como a mieloperoxidase (MPO), ocasionando a morte intracelular do parasita⁷⁷. Rousseau et al. 2001 demonstraram *in vivo* que os grânulos azurofílicos dos neutrófilos auxiliam na eliminação das formas promastigotas de *L. infantum*⁷⁸.

Os neutrófilos também possuem um mecanismo para a eliminação das formas promastigotas conhecido como NETose, ou redes extracelulares dos neutrófilos (NETs- *neutrophils extracellular traps*), que são fibras de redes extracelulares liberadas quando os neutrófilos entram em contato com os microrganismos, estimuladas por citocinas pró-inflamatórias como a IL-8 e INF- γ ⁷⁹. A formação das NETs induz o controle da carga parasitaria, já que sua função é degradar os fatores de virulência, impedindo o escape do parasita e facilitando a fagocitose⁸⁰.

1.7.2 Imunidade Adaptativa

Os macrófagos, células alvo da leishmania, modulam a resposta imune mediada pelas células T para conter a multiplicação de agentes infecciosos. Após a fagocitose, os macrófagos processam e apresentam os antígenos do parasita, ligados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, aos linfócitos T CD4+. Este grupo de linfócitos são subdivididos em perfis que diferem quanto ao padrão de citocinas que produzem quando estimulados⁸¹. As células de perfil Th1 são as componentes chaves da imunidade celular, por induzirem a produção de citocinas eficientes contra a infecção por parasitas intracelulares. As principais citocinas envolvidas neste perfil são a IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF⁸¹. O perfil Th2 está associado à produção de citocinas como IL-4, IL-5 e citocinas inibitórias como a IL-10 e TGF- β , cuja função é suprimir a resposta Th1⁸¹. As citocinas do perfil Th2 estimulam linfócitos B, induzindo a resposta humoral mediada por anticorpos⁸².

A IL-4 está relacionada com a síntese de IgE e IgG, e níveis altos destes anticorpos já foram detectados em pacientes com leishmaniose, o que pode ser útil no diagnóstico. Porém, esses anticorpos parecem não ter um papel muito evidente na doença^{83,84}.

Na leishmaniose visceral americana o estabelecimento da doença depende do balanço entre os perfis Th1 e Th2. Para uma resposta eficaz contra o patógeno ocorre a produção da citocina IL-12 que tem sido apontada como um dos principais componentes da fase inicial da infecção por leishmania^{85,86}. Subsequentemente, a IL-12 estimula o desenvolvimento do perfil Th1, que resulta na produção de citocinas como IFN- γ e TNF, que auxiliam na defesa contra o patógeno⁸¹.

A produção de IFN- γ ativa as propriedades citotóxicas dos macrófagos, produzindo óxido nítrico e resultando na morte intracelular do parasita e a resolução da infecção⁸¹.

A fim de controlar a resposta imune, citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- β , são produzidas⁸⁵. A IL-10 é uma citocina secretada por células Th2 que modula a resposta Th1, suprimindo a expressão de genes que induzem a produção de IFN- γ e TNF^{86,87}, contribuindo para a sobrevivência da leishmania nas células e podendo ocasionar a progressão da doença.

Apesar de estar claro o efeito inibitório de IL-10 sob a produção de IFN- γ , concentrações elevadas destas duas citocinas já foram encontradas em pacientes com a doença ativa. Isso suscitou estudos na tentativa de entender qual o envolvimento destas duas citocinas na patogênese da doença⁸⁸. Níveis altos de IFN- γ e IL-10 foram detectados em células de medula óssea e linfonodos infectados, com redução da IL-10 após a resolução da doença com o uso da terapia^{88,89}. Um estudo realizado na Índia bloqueou os efeitos da IL-10 em culturas de células de aspirados esplênicos de indivíduos com leishmaniose visceral americana. Esse bloqueio favoreceu a produção de IFN- γ e TNF e o controle da doença, sugerindo que a IL-10 pode ser um alvo para a terapia da leishmaniose visceral americana⁹⁰.

O TGF- β tem propriedade supressiva que afeta o desfecho de doenças infecciosas crônicas, facilitando o escape de parasitas⁹¹, e já foi associado com a progressão da leishmaniose visceral americana¹⁰⁵. Níveis elevados de TGF- β já foram encontrados em cultura de células de fígado de camundongos infectados por *L. donovani* ou *L. chagasi*⁹².

Na leishmaniose visceral americana, as células T CD4+ de perfil Th17 também já foram associadas com a resistência do hospedeiro frente à infecção por *L. infantum*⁹³, devido à produção da citocina pró-inflamatória IL-17, que possui atividade leishmanicida sobre os macrófagos infectados⁹³. A resistência à infecção devido a produção desta citocina tem sido observada in vivo no granuloma hepático de camundongos infectados por *L. donovani*. Estes camundongos produziram níveis exacerbados de IL-17, que resultou na diminuição da carga parasitária^{94,95}.

Culturas de células do sangue periférico infectadas por *L. donovani* produziram citocinas como a IL-23 e a IL-1 β e induziram a diferenciação do perfil Th17, que deve complementar o perfil Th1 na proteção contra a leishmaniose visceral americana⁹⁶. A IL-17 também potencializa a produção de óxido nítrico em macrófagos infectados por *L. infantum*⁹⁶.

A hipótese de que o NOD-2 atua como regulador da IL-23 e inibe o perfil Th17 tem sido levantada⁹⁷. Nesse sentido, foi observado que camundongos nocautes para o gene *NOD2* infectados por *L. infantum* produzem níveis mais altos de IL-17. No entanto, elevada carga parasitária também foi observada nestes animais, o que foi associada à resposta Th1 ineficiente com baixa produção de IFN- γ e IL-12. Já nos camundongos selvagens foi observado que a infecção estimula a sinalização do NOD-2 em células dendríticas com a produção de IL-12, dando início a resposta Th1, evidenciando o balanço entre os dois perfis de resposta na infecção pela leishmania⁹⁸.

1.8 Mecanismo de evasão do parasita.

Nos neutrófilos, já foi demonstrado que o LPS presente nas cepas de *L. donovani* induz resistência a atividade microbicida das NETS⁹⁹. Essa resistência auxilia na sobrevivência das formas promastigotas, ocasionando a apoptose dos neutrófilos. Deste modo, os neutrófilos são fagocitados pelos macrófagos, transferindo as formas promastigotas viáveis, num processo denominado “Cavalo de Tróia”¹⁰⁰.

Esse processo pode ser considerado um mecanismo de escape de *L. donovani*¹⁰¹, já que os macrófagos são as últimas células hospedeiras da leishmania, onde ocorre a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas infectantes, que irão disseminar¹⁰².

Todas as espécies patogênicas de leishmania possuem habilidades para a replicação nos vacúolos dos fagolisossomos usando mecanismos de escape¹⁰³.

A leishmania possui fatores de virulência, como as moléculas de superfície metaloproteinase (GP63) e o lipofosfolipídeo glicano (LPG), cuja expressão favorece o escape do parasita contra a lise do sistema complemento e inibem a produção de óxido nítrico pelos macrófagos em resposta ao estímulo de INF- γ ¹⁰⁴. Devido a esse papel, estas moléculas, encontradas nas formas promastigotas e amastigotas, têm sido bastante estudadas¹⁰⁵.

1.9 Susceptibilidade genética à doenças infecciosas.

Os primeiros estudos sobre doenças infecciosas consideravam que para a sua ocorrência era necessária apenas a exposição ao patógeno¹⁰⁶. As primeiras evidências contrárias a esta hipótese ocorreram em 1870, quando Pasteur observou a heterogeneidade de sintomas clínicos entre os indivíduos de populações expostas ao mesmo agente infeccioso¹⁰⁷. A partir disto, investigações em doenças infecciosas, como malária, começaram a busca por componentes genéticos envolvidos no estabelecimento destas doenças¹⁰⁸. Desde então ficou evidente que a exposição ao patógeno é necessária, mas não suficiente para levar ao estabelecimento da doença. Além do patógeno, fatores relacionados ao ambiente e ao hospedeiro exercem importante papel no estabelecimento de doenças infecciosas, que é hoje considerada uma doença de caráter complexo¹⁰⁸.

Os estudos que buscam o esclarecimento sobre o papel da genética humana em doenças podem ter abordagem de genética clássica ou de genética molecular. Os desenhos de estudos de genética clássica são baseados em análises de segregação complexa, estudos com gêmeos, ou estudos de adoção.

Os estudos com gêmeos demonstraram o papel da genética do hospedeiro na susceptibilidade para doenças infecciosas como hanseníase, tuberculose e poliomielite, ao comparar o *background* genético de pares de gêmeos monozigóticos e dizigóticos afetados¹¹⁰⁻¹¹².

Os estudos de genética molecular permitem a aplicação de estratégias variadas para a localização de genes e marcadores associados com doenças. Os estudos de ligação são realizados com *pedigrees* com membros afetados, e avaliam a segregação de marcadores moleculares de acordo com a doença. O resultado em um estudo de ligação é dado em LOD score. Regiões com o LOD score acima de três podem ser consideradas regiões cromossômicas que contém marcadores para a doença¹¹².

Outra alternativa, são os estudos de associação, que podem ser baseados em população ou em família. Nos estudos baseados em famílias verifica-se a transmissão alélica de pais heterozigotos para filhos afetados, através do teste de desequilíbrio de transmissão (TDT)¹²⁸. Os estudos em populações são subdivididos em caso-controle e coorte. Os estudos de caso-controle são retrospectivos, e comparam a frequência de marcadores moleculares em indivíduos saudáveis (controles) e indivíduos com história da doença (casos)¹¹².

Os estudos de caso controle devem ser extremamente cuidadosos na escolha de controles para evitar vieses ou variáveis de confundimento. No caso de doenças infecciosas, é imprescindível que os controles tenham exposição ao agente infeccioso similar aos casos¹¹³.

Uma das abordagens mais utilizadas em epidemiologia genética é a busca por associações em genes candidatos, escolhidos devido ao papel funcional que exercem na doença ou pelos resultados de estudos em larga escala. Em outra vertente estão os estudos do tipo *genome wide*¹¹³.

O sequenciamento do genoma e o avanço das técnicas de genotipagem permitiram o rastreamento de variações genéticas por todo o genoma humano, facilitando a descoberta de novos genes e polimorfismos envolvidos na susceptibilidade às doenças¹¹³.

Os polimorfismos podem ser classificados como microssatélites, contendo repetições de sequências de dois a cinco nucleotídeos, denominados *small tandem repeats* ("STR"); minissatélites, que apresentam variações de repetições de sequências maiores de nucleotídeos, conhecidos como *variable number of tandem repeats* ("VNTR"). No entanto, os polimorfismos mais frequentes e mais estudados são os de base única (SNPs), que são mutações bialélicas pontuais com frequência maior que 1% na população em geral¹¹³.

Quando ocorrem em regiões codificantes do gene, os SNPs podem ser sinônimos, sem causar mudança na sequência de aminoácidos, ou não sinônimos (*missense*), ocasionando alteração na sequência de aminoácidos, podendo acarretar em alteração funcional da proteína¹¹⁴. Estas variações podem ocorrer também em regiões regulatórias do gene, como íntrons e regiões promotoras ou 3'UTR, alterando a quantidade a estabilidade ou o tipo do transcrito¹¹⁵⁻¹¹⁷.

1.10 Genética humana na leishmaniose visceral americana.

A complexidade dos fenótipos clínicos das leishmanioses sugere o envolvimento de múltiplos genes influenciando a susceptibilidade para a doença⁶⁶.

O primeiro estudo genético em leishmaniose visceral americana ocorreu após um surto em duas tribos no Sudão. Inicialmente foi realizado um estudo de ligação em 63 famílias, totalizando 169 crianças com leishmaniose visceral americana na vila Aringa, que mostrou um pico de ligação na banda cromossômica 22q12¹¹⁸. Após isso, foi realizada uma busca por genes candidatos nesse *locus* nesta mesma população. Devido ao seu papel funcional, o gene do receptor de IL-2 (*IL2RB*), localizado na região, foi estudado. Foi demonstrada associação entre o SNP não sinônimo no gene *IL2RB* e a leishmaniose visceral americana. No entanto, estes dados não foram testados em outras populações para validar o papel deste polimorfismo na doença¹¹⁹.

Na tribo Masalit, no Sudão, um estudo com genes candidatos foi realizado investigando os receptores de interferon gama (*IFNGR1*), na região 6q23–q24, e de IL-4 (*ILR4RP2* e *IL4RP1*), na região 5q23.3–q3. Estes três genes foram associados com a susceptibilidade para a leishmaniose visceral americana¹²⁰.

Um estudo de ligação na tribo Masalit também foi realizado e identificou picos de ligação nas regiões 1p22 e 6q27¹²⁰. Apesar de pertencerem à mesma população ancestral, as tribos Masalit e Aringa demonstraram *loci* diferentes de susceptibilidade, o que foi atribuído aos casamentos consanguíneos frequentes nestas tribos¹²¹.

Após estes primeiros estudos, outros vêm sendo desenvolvidos com objetivos de esclarecer a influência da genética na resposta do hospedeiro e no desfecho clínico das leishmanioses. As tabelas 1 e 2 abaixo compilam genes e regiões cromossômicas já envolvidas com as leishmanioses na literatura.

Tabela 1 Principais genes associados à leishmaniose cutânea em estudos caso-controle.

Gene Candidato	Fenótipo	Estatística	População	Referências
<i>MIF</i>	LC	OR 1.79 (p=0,008)	Brasil	Covas et al. 2013
<i>TNF</i>	LC	OR 3.10 (p=0.002)	Brasil	Covas et al. 2013
<i>IL6</i>	LMC	OR 2.55 (p=0,005)	Brasil	Castelluci et al. 2006
<i>TNF</i>	LMC	RR=7,5; p<0.001)	Venezuela	Cabrera et al. 1995
<i>HLA-DRB</i>	LCL	OR 2.92 (p=0,004)	México	Olivio-Diaz et al. 2003
<i>TL4</i>	LC	OR 8.03 (p=0,006)	Irã	Ajdary et al. 2011
<i>IL4</i>	LCL	OR 2.02 (p=0,002)	Irã	Kamali-Sarvestani et al. 2006
<i>IFNG</i>	LCL	OR 5.74 (p=0,002)	Irã	Kamali-Sarvestani et al. 2006
<i>TGF</i>	LC	OR 1.50 (p=0,005)	Brasil	Castellucci et al. 2012
<i>IL1B</i>	LCL	OR 3.23 (p=0.0167)	México	Fernández-Figueiroa et al. 2002
<i>TOLLIP</i>	LC	OR 1.7 p=1.9x(10 ⁻⁸)	Brasil	Araújo et al. 2016

LMC – Leishmaniose mucocutânea **OR** – Odds Ratio **RR** – Risco Relativo **LC** – Leishmaniose cutânea **LCL** – Leishmaniose cutânea localizados.

Tabela 2 Principais genes e regiões candidatas relacionados à leishmaniose visceral americana

Região Candidata	Desenho	Tipo de estudo	Análise estatística	População	Referências
<i>22q12</i>	Familiar	Ligação	LOD SCORE 3.50	Sudão	Bucheton et al. 2007
<i>IL-12</i>	Familiar	Associação	p=0.043	Sudão	Bucheton et al. 2007b
<i>IL-10</i>	CC	Associação	OR 10.21 (p=0,0002)	Irã	Hajilooi et al. 2010
<i>INFG</i>	CC	Associação	OR 3.67 (p=0.045)	Sudão	Salhi et al. 2008
<i>TGFB1</i>	CC	Associação	OR 1.94 (P=0.003)	Brasil	Jeronimo et al. 2007
<i>LECT2</i>	CC	Associação	OR 2.25 (P=0.005)	Brasil	Jeronimo 2007.
<i>IFGN</i>	Familiar	Ligação	LOD 0.548 p=0.0007	Sudão	Mohamed et al. 2003
<i>IL4</i>	Familiar	Ligação	LOD 1.263 (p=0.008)	Sudão	Mohamed et al. 2003
<i>DLL1</i>	Familiar	Associação	OR 3,25 (p=0,001)	Sudão	Fakiola et al. 2011
<i>IL18</i>	CC	Associação	OR 1.40 (p=0,002)	Índia	Kumar et al. 2014
<i>TGFB1</i>	CC	Associação	OR 1.9 (p=0,012)	Brasil	Frade et al. 2011
<i>IL-8</i>	CC	Associação	p=0.002	Irã	Hajilooi et al.2015

CC – Caso controle; **OR** – odds ratio

Estudos de *genome wide* de ligação no Sudão revelaram picos para a doença nas regiões cromossômicas 22q12, 2q23-24, 2q35, 1p22 e 6q27^{120,121}. Com o propósito de investigar se estas regiões também estariam associadas com a doença na população brasileira, estudos com a mesma abordagem foram realizados em famílias da cidade de Natal e São Luís, e evidenciaram picos nas regiões 6q27 e 17q11.1-q21.3¹²².

A região 17q11.1-q21.3 alberga genes envolvidos na susceptibilidade a doenças infecciosas como hanseníase (*CCL4* e *CCL18*) e tuberculose (*D17S250* e *D17S1795*)¹²³. Assim, um estudo de associação familiar foi realizado em Belém com o propósito de testar genes candidatos nestas regiões¹²³. Neste estudo, os genes *CCL1* e *CCL6* apresentaram marcadores de susceptibilidade para a leishmaniose visceral americana¹²³.

Com o intuito de investigar o pico de ligação para a doença na região 6q27, um estudo de associação familiar testou genes nesta região em famílias do Brasil e do Sudão. Na população sudanesa os genes *PHF10*, *C6orf70*, *DLL1*, *PSMB1*, e *TBP* foram associados com a susceptibilidade a leishmaniose visceral americana. Na população brasileira, apenas o gene *DLL1* apresentou associação, o que torna este gene um forte candidato por ter sido validado em duas populações¹²⁴.

Um estudo de associação do tipo *genome wide* (GWAS - *genome wide association study*) foi realizado com duas amostras caso-controle da Índia e duas amostras de base familiar do Brasil. Dados consistentes de associação foram obtidos para o loci *HLA-DRB1-HLA-DQA1*¹²⁴, este estudo não confirmou as associações de outros genes com a doença, previamente descritas. Na população brasileira, ainda foram testados 23 SNPs distribuídos em genes distintos nas regiões 5q23.3 (*IRF1*, *IL5*, *IL13* e *IL4*) e na região 5q31.1 (*IL9*, *LECT2* e *TGFB1*)¹³⁵. Estas duas regiões foram escolhidas por albergar genes associados à susceptibilidade para esquistossomose¹³⁶, e previamente associados à leishmaniose visceral americana na população do Sudão¹²⁰.

Este estudo verificou que os marcadores rs207808, no gene *IL4*, e rs30740, entre os genes *TGFB* e *LECT2*, estavam em desequilíbrio de ligação e associados com a susceptibilidade para a leishmaniose visceral americana na população brasileira¹³⁷.

1.11 Escolha dos genes candidatos

❑ ***NOD2***

O polimorfismo rs8057341 no gene *NOD2* vem sendo associado com a susceptibilidade à hanseníase e a tuberculose em diferentes populações¹³⁸⁻¹⁴⁰. Apesar de ainda não estar claro o papel do *NOD2* na leishmaniose visceral americana, esse gene é um candidato na participação do controle do desfecho desta doença, devido o seu papel inibidor de citocinas IL-23, suprimindo a diferenciação das células Th17 pró-inflamatórias que já foram previamente associadas a susceptibilidade a leishmaniose visceral americana^{94,95,98}.

❑ ***TLR1***

O gene *TLR1* já foi associado com várias doenças infecciosas como a hanseníase, tuberculose e malária¹⁴¹⁻¹⁴³.

O receptor *TLR-1* atua em sinergismo com o *TLR-2*, e este receptor contribui para o desenvolvimento da resposta imune na leishmaniose, e variantes no gene *TLR2* já foram associadas a susceptibilidade para a doença¹⁴⁴. Deste modo, o gene *TLR1* é um gene candidato a ser testado em estudos de associação em leishmaniose visceral americana.

Estudos mostraram a associação dos polimorfismos I602S (rs5743618) e N248S (rs4833095), neste gene com hanseníase^{144,145,146}. Wong et al. realizaram um estudo de caso-controle baseado em população para hanseníase utilizando um microarranjo interrogando variantes em 2.092 genes por todo o genoma. Neste estudo o dado de associação para o polimorfismo rs5743618 foi replicado o que reforça a posição do gene *TLR1* como um forte candidato para associação com doenças causadas por parasitas intracelulares¹⁴⁷. Assim, o estudo dessas variantes deve ser uma oportunidade para elucidar melhor o papel do gene *TLR1* na leishmaniose visceral americana.

IL10

Estudos têm verificado que o polimorfismo rs1800871 na região promotora do gene *IL10* controla a produção desta citocina em diferentes estímulos infecciosos¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. O genótipo heterozigoto deste polimorfismo já foi associado com susceptibilidade para a leishmaniose visceral americana na população iraniana¹³¹. Os efeitos funcionais deste polimorfismo já foram avaliados na leishmaniose cutânea através da cultura de células do sangue periférico estimuladas por *L. brasiliensis*, onde o genótipo CC e o alelo C foram associados com elevados níveis de IL-10, aumentando o risco de desenvolvimento de lesões cutâneas. Este estudo confirmou *in vitro* que este SNP controla a produção de IL-10, o que torna este gene um excelente candidato para estudos genéticos desta doença em outras populações¹³².

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o papel de polimorfismos dos genes candidatos *NOD2*, *IL10* e *TLR1* na leishmaniose visceral americana por meio de estudo de associação do tipo-caso controle na população da região de Bauru, Estado de São Paulo.

2.2 Objetivos Específicos

1. Criar um banco de dados e de DNA genômico de pacientes com leishmaniose visceral americana para estudos de associação em epidemiologia genética com a população da região de Bauru.
2. Testar a associação com a leishmaniose visceral americana, usando o banco criado, para os seguintes marcadores:
 - rs8057341 no gene *NOD2*
 - rs4833095 no gene *TLR1*
 - rs1800871 no gene *IL10*

3. Manuscrito submetido ao Journal of Infection, Genetics and Evolution.

POLYMORPHISMS AT *TLR1*, *IL10* AND *NOD2* GENES ARE ASSOCIATED TO VISCERAL LEISHMANIASIS IN BRAZILIAN POPULATION

Keren Bastos Valezi, Botucatu Medical School, Botucatu, Brazil.

Rodrigo Mendes de Camargo, Botucatu Medical School, Botucatu, Brazil.

Laís Yamada Doretto, Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, Brazil.

Adauto Nunes, Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, Brazil.

José Cláudio Simão, State Hospital Bauru, Bauru, Brazil.

Virgínia Richini Bodelão, Adolfo Lutz Institute, Bauru, Brazil.

Ketelyn Magliani, Adolfo Lutz Institute, Bauru, Brazil.

Priscila Bettoni Ballalai Mangilli, Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, Brazil.

Ana Carla Pereira Latini, Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, Brazil.

Highlights: Polymorphisms at candidate genes TLR1, NOD2 and IL10 are for the first time associated with susceptibility to visceral leishmaniasis in Brazilian population.

Abstract

Leishmaniasis is an antropozoonotic disease caused by the protozoan of the genus *Leishmania*. It presents three clinical forms, known as visceral leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis. Visceral leishmaniasis affects two million individuals annually in the worldwide. Genetic factors involved in the host-parasite interplay have been associated with the clinical outcome of the disease. This study investigated for the first time the association of polymorphisms at the candidate genes *IL10*, *NOD2* and *TLR1* with visceral leishmaniasis in Brazilian population. For that, we have chosen three markers previously associated to infections caused by intracellular parasites in Brazilian population. We have genotyped 135 patients and 380 healthy controls. The presence of G allele of the rs4833095 at *TLR1* gene was strongly associated with susceptibility to this disease: G allele analysis (OR 2.04; CI 1.22-3.39; p-value 0.0061); GG genotype analysis (OR 3.87; IC95 1.85-8.08; p-value 0.0003); G carriers analysis (OR 2.5; CI95 1.33-5.00; p-value 0.0047). For *NOD2* gene we also found an association for AA genotype (OR 2.07 IC95 1.05- 4.05; p-value 0.0335) of the polymorphism rs8057341. Finally, we could confirmed the association of marker rs1800871 in the promoter region of the *IL10* gene with susceptibility to visceral leishmaniasis, for TT genotype (OR 2.34; CI95 1.11-4.94 p-value 0.0245) **Conclusion.** Our data demonstrate for the first time the association of these candidate genes with visceral leishmaniasis in Brazilian population, placing these markers as strong candidates in the composition of future genetic panels to predict risk of infections in Brazilian population, and for meta-analysis studies in visceral leishmaniasis.

Key word: visceral leishmaniasis, genetic epidemiology, *IL10*, *TLR1*, *NOD2*.

Manuscript word count: 5,656

Abstract word count: 249

Footnotes

The authors declare no conflicts of interest.

This work was supported by: Scholarships from CAPES

These data were not presented in any scientific meeting.

Correspondence: Ana Carla Pereira Latini

Instituto Lauro de Souza Lima Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, Km 225/226, Aimorés, CEP: 17034-97, Bauru, São Paulo State, Brazil.

Phone number: +55 14 3103-5944

E-mail: anacarlal@gmail.com

1. Background

Visceral leishmaniasis or calazar is a neglected disease of public health importance due to the variability of clinical manifestations, and is considered the second major cause of parasitic death worldwide¹. Leishmaniasis is caused by protozoan parasites of *Leishmania donovani* complex, and transmitted to humans through the bite of the female sand fly *Lutzomyia longipalpis*. It is estimated that more than two million people develop the disease annually and 350 million are at risk. Brazil is one of the six countries that concentrates 90% of new cases annually¹. The disease affects mainly children and elderly. Nutritional status, socioeconomic conditions and HIV coinfection are also factors associated with the disease outcome^{2,3,4}. The patient may initially be asymptomatic or develop into clinical symptoms such as splenomegaly, hepatosplenomegaly, lymphadenopathy and weight loss^{5,6}. These symptoms can be confused with other endemic diseases, making it difficult to introduce adequate therapy and increasing the fatality rate, which reaches 90% when left untreated.⁶

Clinical manifestations in visceral leishmaniasis depends on an effective cellular immune response, where the Th1 profile is associated to cure, while the Th2 profile is associated to disease progression^{7,8}. This ability to develop different clinical phenotypes has been associated with the genetic background of the host, which has incited the search for genetic polymorphisms as risk markers for disease⁹. Genomic scan linkage studies found peaks for visceral leishmaniasis at 17q11-q2 and 6q27 chromosomal regions¹⁰⁻¹². Some candidate genes present replicated and validated association data such as *DLL1*¹², *IL10*^{13,14}, *INFG*^{15,16}, *IL18*¹⁷ and *IL4*¹⁵. Further studies have also shown association data for polymorphisms at *HLA-DR1B*¹⁸, *HLA-DQA1*¹⁸, *LECT2*¹⁹, *TGFB1*¹⁹ genes.

IL-10 has been extensively studied in visceral leishmaniasis, since it presents exacerbated levels in patients with active disease, which decreases after the therapy²⁰. Studies have shown that rs1800871 polymorphism at the promoter region of the *IL10* gene controls the production of this cytokine^{14,21}.

The heterozygote genotype was associated to susceptibility for visceral leishmaniasis in the Sudanese population¹⁴. Functional studies focusing on this polymor-

phism report that individuals with CC genotype produce higher levels of IL-10 in cultured cells stimulated with *Leishmania brasiliensis*, reinforcing the importance of this marker in the outcome of leishmaniasis.¹³

Toll-like (TLRs) and nod-like (NLRs) receptors are part of the so-called pattern recognition receptors (PRRs) that act by recognizing pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) at the early stages of infection²². In visceral leishmaniasis, variants at *TLR2* gene have already been associated with susceptibility to the diseases^{23,24}. As TLR-2 acts in synergism with TLR-1, and genetic variants of *TLR1* have already been associated to several diseases caused by intracellular pathogens, such as leprosy, tuberculosis and malaria, *TLR1* is a candidate gene for association with leishmaniasis²⁵⁻²⁷.

The NOD-2 receptor is part of the NLRs group and induces the production of cytokines such as IL-23, leading to the differentiation of Th17 profile CD4 + T cells that have already been associated with an effective host response against *L. infection Infantum*²⁸⁻³¹. The hypothesis that NOD-2 acts as a regulator of IL-23 and inhibition of the Th17 profile is also described in Crohn's disease³². Thus, this receptor is important for regulating the balance between IL-23 and IL-17 cytokines, which should certainly influence the outcome of leishmania infection^{28,29}. The marker rs8057341 at *NOD2* gene has already been associated with protection for leprosy in Brazil³³. Considering the functional importance of NOD-2 in visceral leishmaniasis, this marker should be representative of the possible association of this gene with leishmaniasis in our population.

So, in the present study, we investigated the association between polymorphisms at *NOD2* (rs8057341), *TLR1* (rs4833095) and *IL10* (rs1800871) candidate genes and the risk of visceral leishmaniasis in a case-control design from Brazilian population.

2. Materials and Methods

2.1 Subjects and study design

This study enclosed a 515 individuals living in the city of Bauru, State of São Paulo, Brazil, comprising 135 cases of visceral leishmaniasis and 380 healthy controls. The group of cases included 45 females and 90 males. The cases were selected from the State Hospital of Bauru, with confirmed clinical diagnosis for visceral leishmaniasis from 2004 to 2017. For control group 252 females and 128 males were selected. The controls were selected from blood donors of the Hemonúcleo of the Base Hospital of Bauru, with no case history for visceral leishmaniasis. Controls were selected from the same geographical area as the cases. The mean age of cases was 30 years old and 36 years old for controls.

Regarding ethnicity, each subject was classified as Black, Caucasoid or Mestizo. Controls were classified into 240 Caucasoid, 104 Mestizos and 28 Blacks, while cases were classified into 82 Caucasoid and 53 Blacks. The ethnic group of the cases were classified according to the medical records of the State Hospital of Bauru.

The investigation of HIV coinfection in the group of cases pointed out that 78 were negative, 26 positive and 31 had no test.

All participants were included in the study after signing the Informed Consent Term. Informed consent was obtained from parents of children under 18 years old. This work was approved by the Ethics Committee of the Lauro de Souza Lima Institute (Number 1.258.479)

2.2 SNPs Selection

These markers were selected based on previous association data for infectious diseases caused by intracellular pathogens in Brazilian population, which suggest that they are informative of the association of these candidate genes with diseases for this population.

To verify the association between *NOD2* gene and visceral leishmaniasis, the rs8057341 marker was selected since AA genotype was associated to leprosy resistance in Brazilian population³³.

At *TLR1* candidate gene we selected rs4833095 polymorphism since the GG genotype was associated to leprosy susceptibility in Brazilian population²⁶.

The rs1800871 marker in the promoter region of the *IL10* gene has already been associated with leprosy and tuberculosis susceptibility in Brazilian population²¹. Of note, this polymorphism was already associated to visceral leishmaniasis in Sudanese population¹⁴.

2.3 DNA extraction and genotyping of SNPs

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes samples from both cases and controls using the *salting out* method³⁴.

Of the 135 cases, a total of 80 DNA samples were obtained from bone marrow puncture material archived in *paraffin blocks*, from the Service of Pathology of the State Hospital of Bauru. For these samples, we used the kit QIAamp® DNA FFPE Tissue (Qiagen, Hilden, Germany).

Genotyping was made by allelic discrimination using Taqman assays (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) on ViiA7 equipment and StepOnePlus equipment (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.4 Statistical Analysis

Genotype, allelic and carrier frequencies obtained for cases and control groups were analyzed using logistic regression model to calculate odds ratios (OR), confidence interval 95% and p-values. Analyses with adjustment for gender, ethnicity and HIV-coinfection as covariates were also performed in all analyzes.

In order to verify the interference of HIV coinfection on our results, the analyses were also done excluding the coinfecting patients.

Genotype frequencies were used for the chi-square test to evaluate these distributions regarding Hardy-Weinberg (HW) equilibrium.

The analyses were performed using the R statistical software for Windows (version 2.14.0), adopting p-value ≤ 0.05 as the statistical significance level.

2. RESULTS

3.1 Allele G of the rs4833095 at *TLR1* is associated with susceptibility to visceral leishmaniasis in Brazilian patients.

Our data point to a strong association between the presence of G allele for rs4833095 SNP at *TLR1* and susceptibility to visceral leishmaniasis. To test this we have genotyped 376 controls and 118 patients.

The GG genotype was associated with susceptibility to the disease in the unadjusted analyzes (OR 3.12; 95%CI 1.68-5.78; p-value 0.0003) and after adjustments (OR 3.43; 95%CI 1.74-6.78; p-value 0.0004). The AG genotype results also point to association of susceptibility before (OR 1.84; 95%CI 1.01-3.34; p-value 0.0448) and after (OR 1.98; 95%CI 1.04-3.75; p-value 0.0354) adjustments. Comparing allele frequencies, G allele confirmed this association with susceptibility without (OR 1.82; 95%CI 1.18-2.78; p-0.0059) and with adjustments (OR 1.89; 95%CI 1.18-3.04; p-value 0.0080). In the same sense, we observed that G allele carrier present susceptibility to visceral leishmaniasis in the analyses with no adjustment for covariates (OR 2.30; 95%CI 1.31-4.03; p-value 0.0036). When adjustments for the covariates were made, the association of susceptibility remained present (OR 2.45; 95%CI 1.34-4.48; p-value 0.0033).

To test the interference of HIV coinfection on results we excluded coinfecting patients from our analyses. Of note, all associations were maintained for the G allele in the unadjusted analyzes (OR 1.89; 95%IC 1.18-3.03; p-value 0.0076) and in analyzes with adjustment for sex and ethnicity (OR 2.04; 95IC% 1.22-3.39; p-value 0.0061). The association of susceptibility was also maintained for the GG genotype in the unadjusted analyzes (OR 3.33; 95IC% 1.68-6.60; p-value 0.0006) and in analyzes with adjustment for sex and ethnicity (OR 3.87; 95IC% 1.85-8.08 p-value 0.003). In the same sense, the carriers of the G allele maintained the association in the analyzes without adjustment (OR 2.38; 95IC% 1.27-4.46; p-value 0.0067) and for the unadjusted analyzes (OR 2.5 95I% 1.33-5.00; p-value 0.0047)

The frequencies and association data obtained for this polymorphism are described in Table 1.

3.2. AA genotype of the rs8057341 at *NOD2* gene is associated with susceptibility to visceral leishmaniasis in Brazilian patients.

For the marker rs8057341 at *NOD2*, 372 controls and 103 patients were genotyped. The AA genotype was associated with susceptibility to visceral leishmaniasis (OR 2.49; 95%CI 1.38-4.49; p-value 0.024). The same association was observed when the analyses were adjusted for covariates sex and ethnicity (OR 2.23; 95%CI 1.15-4.30; p-value 0.0169).

In the analyses excluding HIV coinfection the AA genotype for rs8057341 remained associated to visceral leishmaniasis (OR 2.07; 95%CI 1.05-4.05; p-value 0.033) in the analyzes without adjustment for the covariates. The result lost significance when adjustments were made for gender and ethnicity (OR 2.07 IC95% 1.05- 4.05; p-value 0.0335)

The frequencies and association data obtained for this polymorphism are described in Table 2.

3.3 TT genotype of rs1800871 *IL10* is associated with susceptibility to visceral leishmaniasis in Brazilian patients.

To test rs1800871 in the promoter region of *IL10* gene, 374 controls and 90 cases were genotyped. The TT genotype showed an association with susceptibility to visceral leishmaniasis (OR 2.79; 95%CI 1.45-5.37; p-value 0.002). After adjustments the association was also observed (OR 2.43; 95% CI 1.14-5.14; p-value 0.02). An association to susceptibility was also observed for T allele (OR 1.65; 95%CI 1.03-2.64; p-value 0,034), which was not maintained after adjustments. In the analyses to exclude the interference of HIV coinfection the TT genotype association remained in the analyzes without adjustment (OR 2.34; 95%CI 1.11-4.94; p-value 0,024). The significance was not observed when performed adjustments for covariates (OR 2.07; 95IC% 0.90-4.78; p-value 0.0862).

The frequencies and data obtained for this marker are described in Table 3.

Of note, all the genotype distributions was in the Hardy-Weinberg equilibrium.

3. DISCUSSION

Complex segregation analysis in Brazilian pedigrees and linkage studies have pointed the importance of genetic components dictating the leishmaniasis visceral, encouraging studies to dissect the human genome searching for variants involved in this risk^{10,11,15}. Herein, from a candidate gene approach, we demonstrated, for the first time, associations between *TLR1* and *NOD2* variants and visceral leishmaniasis in Brazilian population. We also validated for Brazilian population the association reported to rs1800871 marker, in the promoter region of the *IL10* gene, and this disease in Iran population. These genes have already been associated to a myriad of infectious diseases, such as leprosy, tuberculosis and malaria^{33,40}.

The role of TLRs in visceral leishmaniasis has been studied to better understand the clinical outcome of the disease. The TLR-2, TLR-4 and TLR-9 receptors participate in the recognition of different species of leishmania^{35,36}. One study on vaccine in cutaneous leishmaniasis showed protection against infection by *L. panamensis* conferred by the activation of the heterodimer TLR-1/TLR-2, which could not be observed for the *L. infantum*³⁷. The Arg735Gln polymorphism in the *TLR2* gene was associated with susceptibility to visceral leishmaniasis²⁴. In addition, the non-synonymous rs4833095 at *TLR1* gene was already associated with leprosy susceptibility in Brazilian population²⁶. Based on these functional and genetic studies, we tested the rs4833095 polymorphism in the *TLR1* gene and we found that the presence of G allele is associated to an important increase in the risk of visceral leishmaniasis in the population tested.

After excluding HIV coinfecting cases, all results observed for the G allele were maintained, reinforcing the strong association between rs4833095 in the *TLR1* gene and visceral leishmaniasis as independent of HIV. Willie et al. 2014 have described an association of susceptibility between the rs5743551 and rs5743618 markers in the *TLR1* gene and HIV infection in North American individuals³⁸. The SNP rs5743551 is in linkage disequilibrium with the non-synonymous markers rs5743618 and rs4833095. The SNP rs573551 is in an intron, therefore, the effects may be a reflection of the linkage disequilibrium with rs4833095.

Analysis of the haplotype formed by rs573551 and rs4833095 SNPs showed association of susceptibility to sepsis and interference in the level of cytokines in patients with leprosy^{39,40}. Studies have shown that the marker rs4833095 induces a low production of TNF and IL-10 cytokines when stimulated with *Mycobacterium leprae*²⁶. These data confirm the importance of rs4833095 SNP in infectious diseases. Our data reinforce this importance and the rs4833095 marker as informative for the association of this gene with diseases caused by intracellular parasites in Brazilian population. This is the first study showing the association of the *TLR1* gene with visceral leishmaniasis, and functional studies are needed to verify the role of this polymorphism in controlling the immune response against *L. infantum* infection.

Our study reported the association between the AA genotype of the rs8057341 in the *NOD2* gene and visceral leishmaniasis. The role of NOD-2 has been described in visceral leishmaniasis regulating Th1 and Th17 responses in dendritic cells^{31,32}. The hypothesis that NOD-2 acts as a regulator of IL-23 and inhibition of the Th17 profile is also described in Chron's disease³³. Mice infected with *Leishmania infantum* had increasement in signaling of NOD-2 in dendritic cells, producing IL-12 cytokine and initiating the Th1 response. However, this mechanism is a negative regulator in the synthesis of IL-23, inhibiting the differentiation of Th17 that has a role of potentiating the production of nitric oxide by infected macrophages. On the other hand, knockout mice for *NOD2* show failure of IL-12 signaling resulting in inefficient Th1 response and persistence of parasites³⁰⁻³².

The association of *NOD2* gene with diseases caused by intracellular parasites was first evidenced for tuberculosis⁴¹. In the Brazilian population, the marker rs8057341 was associated with leprosy resistance, and these data were replicated for several populations^{33,42}, which reinforces the role of this variant as an informative marker for *NOD2* gene associations with infectious diseases.

When we excluded patients coinfectd with HIV, the AA genotype at rs8057341 remained associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. No genetic study has demonstrated association of markers in the *NOD2* gene and HIV status, and there are few studies demonstrating the role of NOD-2 in HIV virus recognition. Cardinaud et al. 2017 demonstrated that stimulating NOD-2 production reduced virus replication in dendritic cell cultures by producing specific T lymphocytes against the HIV virus⁴³.

Herein, we found that the TT genotype of the rs1800871 in the promoter region of the *IL10* is associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. The same allele was associated with leprosy susceptibility in Brazilian population²¹. This polymorphism has already been associated to several infectious diseases, such as cutaneous leishmaniasis, leprosy and tuberculosis^{13,22}. In the population of Iran, the CT genotype of this marker was associated with susceptibility to visceral leishmaniasis, while the TT genotype was associated with protection¹⁴. A functional study with the Brazilian population showed that the T allele carriers produce lower levels of IL-10 in cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated with *Mycobacterium leprae*, proving the importance of this marker¹⁶.

When we excluded patients coinfecting with HIV, the TT genotype remained associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. However, the association data were more subtle. A stratified analysis should be performed to a better interpretation regarding the role of this marker in the coinfection in our population, which is one limitation of this study, since we could not perform these analyses due to the low number of samples. The marker rs1800871 has been associated with susceptibility to the progression to AIDS in patients infected with HIV. A study with HIV-infected European American patients confirmed that the haplotype formed by rs1800896, rs1800872 and rs1800871, and these markers, can affect the ability of produce IL-10, resulting in disease progression⁴⁴.

The association of rs1800896 and rs1800872 also in the *IL10* promoter region and HIV status has been demonstrated in several populations in Europe, India and Brazil, reinforcing the importance of this region for the progression of the disease⁴⁴. Since the marker rs1800871 has been associated with both diseases isolated, this marker may be informative for future studies to understand the influence of genetics on the pathogenesis of coinfection.

We have demonstrated for the first time the association between *TLR1* and *NOD2* genes with visceral leishmaniasis in the Brazilian population, as well as we replicated the association data for the SNP rs1800871 in the *IL10* gene in this population. These data support the importance of these genes for infectious diseases caused by intracellular parasites, as well as reinforce the role of these markers in the Brazilian population, placing them as strong candidates in the composition of future genetic panels to predict risk of infections, and for meta-analysis studies in visceral leishmaniasis.

ACKNOWLEDGE

We would like to thank all the patients who participated in this study. To the financial support of CAPES. To the technical team of Patology Service of the Lauro de Souza Lima Institute and State Hospital of Bauru.

REFERENCES

1. World Health Organization [Internet]. Leishmaniasis. [Citado em 09 de janeiro de 2017] Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
2. Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury AN, Romero GA, et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Sep 18;8(9):e3136. doi:10.1371/journal.pntd.0003136. eCollection 2014 Sep. Review. PubMed PMID:25233461; PubMed Central PMCID: PMC4169383.
3. Gama ME, Gomes CM, Silveira FT, Laurenti MD, Gonçalves Eda G, Silva AR, Corbett CE. Severe visceral leishmaniasis in children: the relationship between cytokine patterns and clinical features. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013 Nov-Dec;46(6):741-5. doi: 10.1590/0037-8682-0203-2013. PubMed PMID: 24474016.
4. Palumbo E. Visceral leishmaniasis in children: a review. *Minerva Pediatr*. 2010 Aug;62(4):389-95. Review. PubMed PMID: 20940672.
5. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004 Sep;27(5):305-18. Review. PubMed PMID: 15225981.
6. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 2007 Nov;5(11):873-82. Review. PubMed PMID:17938629.
7. Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*. 2012;3:251. doi:10.3389/fimmu.2012.00251.

8. Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett.* 2005 Jun 15;99(1):17-23. Epub 2005 Feb 17. Review. PubMed PMID: 15894106. Pacheco AG, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers.* 2009;27(3-4):173–86.
9. Pacheco AG, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers.* 2009;27(3):173-86. doi: 10.3233/DMA-2009-0654. Review. PubMed PMID: 19893211; PubMed Central PMCID: PMC3835071.
10. Jamieson SE, Miller EN, Peacock CS, Fakiola M, Wilson ME, Bales-Holst A et al. Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. *Genes Immun.* 2007 Jan;8(1):84-90. Epub 2006 Nov 23. PubMed PMID: 17122780; PubMed Central PMCID: PMC2495017.
11. Miller EN, Fadl M, Mohamed HS, et al. Y Chromosome Lineage- and Village-Specific Genes on Chromosomes 1p22 and 6q27 Control Visceral Leishmaniasis in Sudan. Mountain J, ed. *PLoS Genetics.* 2007;3(5):e71. doi:10.1371/journal.pgen.0030071.
12. Fakiola M, Miller EN, Fadl M, et al. Genetic and Functional Evidence Implicating *DLL1* as the Gene That Influences Susceptibility to Visceral Leishmaniasis at Chromosome 6q27. *The Journal of Infectious Diseases.* 2011;204(3):467-477. doi:10.1093/infdis/jir284.
13. Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol.* 2008 May1;180(9):6139-48. PubMed PMID: 18424735.
14. Hajilooi M, Ahmadi A, Lotfi P, Matini M, Jafari D, Bazmani A et al. Is the polymorphism at position -1082 of IL-10 gene associated with visceral leishmaniasis? *Iran J Public Health.* 2014 Aug;43(8):1107-12. PubMed PMID:25927040; PubMed Central PMCID: PMC4411907.

15. Mohamed HS, Ibrahim ME, Miller EN, Peacock CS, Khalil EA, Cordell HJ, et al. Blackwell JM. Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan: linkage and association with IL4 and IFNGR1. *Genes Immun.* 2003 Jul;4(5):351-5. PubMed PMID: 12847550.
16. Salhi MA, Ibrahim ME, Blackwell JM, et al. IFNG and IFNGR1 gene polymorphisms and susceptibility to post kala-azar dermal leishmaniasis in Sudan. *Genes and immunity.* 2007;8(1):75-78. doi:10.1038/sj.gene.6364353.
17. Kumar D, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S. Association of interleukin-18 gene polymorphism with susceptibility to visceral leishmaniasis in endemic area of Bihar, an Indian population. *Scientific World Journal.* 2014;2014:852104. doi:10.1155/2014/852104. Epub 2014 Oct 22. PubMed PMID: 25405235; PubMed Central PMCID: PMC4227453.
18. Jeronimo SM, Holst AK, Jamieson SE, Francis R, Martins DR, Bezerra FL et al. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. *Genes Immun.* 2007 Oct;8(7):539-51. Epub 2007 Aug 23. PubMed PMID: 17713557; PubMed Central PMCID: PMC2435172.
19. Frade AF, Oliveira LC, Costa DL, Costa CH, Aquino D, Van Weyenbergh J et al. TGFB1 and IL8 gene polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect Genet Evol.* 2011 Jul;11(5):912-6. doi: 10.1016/j.meegid.2011.02.014. Epub 2011 Mar 2. PubMed PMID: 21376140.
20. Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, Brodskyn C, Costa J, Barral-Netto M, Barral A. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis.* 2005 Dec 19;5:113. PubMed PMID: 16364177; PubMed Central PMCID: PMC1343567.
21. Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IM, Parelli FP et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 2009 Mar;10(2):174-80. doi: 10.1038/gene.2008.97. Epub 2008 Dec 25. PubMed PMID: 19110537.

22. Abbas A. *Imunologia Básica*. 3ed. São Paulo. Elsevier. 2009.
23. Sacramento LA, da Costa JL, de Lima MHF, et al. Toll-Like Receptor 2 Is Required for Inflammatory Process Development during *Leishmania infantum* Infection. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:262. doi:10.3389/fmicb.2017.00262.
24. Ejghal R, Hida M, Bennani ML, Meziane M, Aurag R, Lemrani M. The TLR2 and TLR4 gene polymorphisms in Moroccan visceral leishmaniasis patients. *Acta Trop*. 2016;158:77–82.
25. Schurz H, Daya M, Möller M, Hoal EG, Salie M. TLR1, 2, 4, 6 and 9 Variants Associated with Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015 Oct 2;10(10):e0139711. doi:10.1371/journal.pone.0139711. e Collection 2015. Review. PubMed PMID: 26430737; PubMed Central PMCID: PMC4592262.
26. Marques C de S, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LT, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis*. 2013 Jul;208(1):120-9. doi: 10.1093/infdis/jit133. Epub 2013 Apr 1. PubMed PMID: 23547143.
27. Hahn WO, Harju-Baker S, Erdman LK, Krudsood S, Kain KC, Wurfel MM, Liles WC. A common TLR1 polymorphism is associated with higher parasitaemia in a Southeast Asian population with *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J*. 2016 Jan 6;15:12. doi: 10.1186/s12936-015-1071-y. PubMed PMID: 26738805; PubMed Central PMCID: PMC4704253.
28. Sheel M, Beattie L, Frame TC, de Labastida Rivera F, Faleiro RJ et al. IL-17A-Producing $\gamma\delta$ T Cells Suppress Early Control of Parasite Growth by Monocytes in the Liver. *J Immunol*. 2015 Dec 15;195(12):5707-17. doi:10.4049/jimmunol.1501046. Epub 2015 Nov 4. PubMed PMID: 26538396.

29. Quirino GF, Nascimento MS, Davoli-Ferreira M, Sacramento LA, Lima MH, Almeida RP, et al. Interleukin-27 (IL-27) Mediates Susceptibility to Visceral Leishmaniasis by Suppressing the IL-17-Neutrophil Response. *Infect Immun*. 2016 Jul 21;84(8):2289-98. doi: 10.1128/IAI.00283-16. Print 2016 Aug. PubMed PMID: 27245409; PubMed Central PMCID: PMC4962641
30. Nascimento MS, Ferreira MD, Quirino GF, Maruyama SR, Krishnaswamy JK et al. NOD2-RIP2-Mediated Signaling Helps Shape Adaptive Immunity in Visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2016 Dec 1;214(11):1647-1657. Epub 2016 Sep 20. PubMed PMID: 27651416.
31. Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Júnior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie M S et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. *J Infect Dis*. 2015 Mar 15;211(6):1015-26. doi: 10.1093/infdis/jiu531. Epub 2014 Oct 1. PubMed PMID: 25274569.
32. Brain O, Owens BM, Pichulik T, Allan P, Khatamzas E, Leslie A et al. The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. *Immunity*. 2013 Sep 19;39(3):521-36. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.035. PubMed PMID: 24054330.
33. Sales-Marques C, Salomão H, Fava VM, Alvarado-Arnez LE, Amaral EP, Cardoso CC et al. NOD2 and CCDC122-LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians. *Hum Genet*. 2014 Dec;133(12):1525-32. doi: 10.1007/s00439-014-1502-9. Epub 2014 Nov 4. PubMed PMID: 25367361
34. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988;16(3):1215.
35. Faria MS, Reis FCG, Lima APCA. Toll-like receptors in *Leishmania* infections: Guardians or promoters? *J Parasitol Res*. 2012;2012.

36. Murray HW, Zhang Y, Zhang Y, Raman VS, Reed SG, Ma X. Regulatory actions of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 in *Leishmania donovani* infection in the liver. *Infect Immun*. 2013 Jul;81(7):2318-26. doi: 10.1128/IAI.01468-12. Epub 2013Apr 15. PubMed PMID: 23589575; PubMed Central PMCID: PMC3697629.
37. Jayakumar A, Castilho TM, Park E, Goldsmith-Pestana K, Blackwell JM,McMahon-Pratt D. TLR1/2 activation during heterologous prime-boost vaccination(DNA-MVA) enhances CD8+ T Cell responses providing protection against *Leishmania (Viannia)*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Jun;5(6):e1204. doi:10.1371/journal.pntd.0001204. Epub 2011 Jun 14. PubMed PMID: 21695103; PubMedCentral PMCID: PMC3114751.
38. Willie B, Hall N, Stein C, et al. Association of *toll-like receptor* polymorphisms with HIV status in North Americans. *Genes and immunity*. 2014;15(8):569-577. doi:10.1038/gene.2014.54.
39. Santana NL, Rêgo JL, Oliveira JM, Almeida LF, Braz M, Machado LM et al. Polymorphisms in genes TLR1, 2 and 4 are associated with differential cytokine and chemokine serum production in patients with leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017 Apr;112(4):260-268. doi: 10.1590/0074-02760160366.Epub 2017 Mar 2. PubMed PMID: 28327786; PubMed Central PMCID: PMC5354609.
40. Hahn WO, Harju-Baker S, Erdman LK, Krudsood S, Kain KC, Wurfel MM, Liles WC. A common TLR1 polymorphism is associated with higher parasitaemia in a Southeast Asian population with *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J*. 2016 Jan 6;15:12. doi: 10.1186/s12936-015-1071-y. PubMed PMID: 26738805; PubMed Central PMCID: PMC4704253.
41. Wang C, Chen Z-L, Pan Z-F, et al. *NOD2* Polymorphisms and Pulmonary Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Biological Sciences*. 2014;10(1):103-108. doi:10.7150/ijbs.7585.
42. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, et al. Common polymorphisms in the *NOD2* gene region are associated with leprosy and its reactive states. *The Journal of infectious diseases*. 2010;201(9):1422-1435. doi:10.1086/651559.

43. Cardinaud S, Urrutia A, Rouers A, Coulon PG, Kerveyan J, Richetta C et al. Triggering of TLR-3, -4, NOD2, and DC-SIGN reduces viral replication and increases T-cell activation capacity of HIV-infected human dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2017 May;47(5):818-829. doi: 10.1002/eji.201646603. Epub 2017 Apr 13. PubMed PMID: 28266028.
44. Oleksyk TK, Shrestha S, Truelove AL, Goedert JJ, Donfield SM, Phair J et al.. Extended IL10 haplotypes and their association with HIV progression to AIDS. *Genes Immun.* 2009 Jun;10(4):309-22. doi: 10.1038/gene.2009.9. Epub 2009 Mar 19. PubMed PMID: 19295541; PubMed Central PMCID: PMC3664918.

TABLES

Table 1. Allelic, genotypic and carrier frequencies of *TLR1* gene polymorphism (rs4833095) in 118 cases and 376 controls. HIV coinfection excluded analysis in a 93 cases with visceral leishmaniasis in samples from Bauru-SP.

SNP	All cases.			
rs4833095	Control	Case	OR (95% CI) p-value	OR (95% CI) p-value ^a
A	0.51	0.36	*	*
G	0.49	0.64	1.82 (1.18-2.78) 0.0059	1.89 (1.18-3.04) 0.0080
AA	105 (0.28)	17 (0.14)	*	*
AG	174 (0.46)	52 (0.44)	1.84 (1.01-3.35) 0.0448	1.98 (1.04-3.75) 0.0354
GG	97 (0.26)	49 (0.42)	3.12 (1.68-5.78) 0.0003	3.43 (1.74-6.78) 0.0004
G carrier			2.30 (1.31-4.03) 0.0036	2.45 (1.34-4.48) 0.0033
	n=376	n=118		

SNP	HIV coinfection excluded.			
rs4833095	Controls	Case	OR (95% CI) p-value	OR (95% CI) p-value ^a
A	0.51	0.35	*	*
G	0.49	0.65	1.89 (1.18-3.03) 0.0076	2.04 (1.22-3.39) 0.0061
AA	105 (0.28)	13 (0.14)	*	*
AG	174 (0.46)	40 (0.43)	1.8 (0.94-3.63) 0.0707	1.97 (0.97-3.99) 0.0570
GG	97 (0.26)	40 (0.43)	3.33 (1.68-6.60) 0.0006	3.87 (1.85-8.08) 0.0003
G carrier			2.38 (1.27-4.46) 0.0067	2.5 (1.33-5.00) 0.0047
	n=376	n=93		

Abbreviation: OR - *odds ratio*; CI - confidence interval of 95%.

^a Logistic regression analyzes, OR and p-value were adjusted for covariates sex and ethnicity.

*Indicates the baseline for comparison.

Table 2. Allelic, genotypic and carrier frequencies of *NOD2* gene polymorphism (rs8057341) in 103 cases and 372 controls. HIV coinfection excluded analysis in a 81 cases with visceral leishmaniasis in samples from Bauru-SP.

SNP	All cases.			
rs8057341	Control	Case	OR (95% CI) p-value	OR (95% CI) p-value ^a
A	0.32	0.42	1.54 (0.99-2.41) 0.0541	1.49 (0.90-2.44) 0.1151
G	0.68	0.59	*	*
AA	44 (0.12)	26 (0.25)	2.49 (1.38-4.49) 0.0024	2.23 (1.15-4.30) 0.0169
AG	151 (0.41)	36 (0.35)	1.00 (0.61-1.64) 0.9851	1.00 (0.58-1.74) 0.9766
GG	177 (0.48)	41 (0.40)	*	*
A carrier			1.33 (0.86-2.08) 0.1938	1.30 (0.80-2.14) 0.2823
	n=372	n=103		

SNP	HIV coinfection excluded.			
rs8057341	Controls	Case	OR (95% CI) p-value	OR (95% CI) p-value ^a
A	0.32	0.4	1.41 (0.86-2.32) 0.1683	1.28 (0.75-2.19) 0.3527
G	0.68	0.6	*	*
AA	44 (0.12)	17 (0.21)	2.07 (1.05-4.05) 0.0335	1.67 (0.81-3.46) 0.1613
AG	151 (0.41)	31 (0.38)	1.01 (0.64-1.88) 0.7247	1.06 (0.59-1.88) 0.8630
GG	177 (0.48)	33 (0.41)	*	*
A carrier			1.32 (0.81-2.15) 0.2642	1.21 (0.72-2.06) 0.4604
	n=372	n=81		

Abbreviation: OR - *odds ratio*; CI - confidence interval of 95%.

^a Logistic regression analyzes, OR and p-value were adjusted for covariates sex and ethnicity.

*Indicates the baseline for comparison.

Table 3. Allelic, genotypic and carrier frequencies of *IL10* gene polymorphism (rs1800871) in 90 cases and 374 controls. HIV coinfection excluded analysis in 69 cases with visceral leishmaniasis in samples from Bauru-SP

SNP rs1800871	All cases.			
	Control	Case	OR (95% CI) p-value	OR (95% CI) p-value ^a
C	0.66	0.54	*	*
T	0.34	0.46	1.65 (1.03-2.64) 0.0341	1.55 (0.82-2.61) 0.0960
CC	166 (0.44)	29 (0.32)	*	*
CT	165 (0.44)	40 (0.44)	1.38 (0.82-2.34) 0.2207	1.42 (0.80-2.52) 0.2243
TT	43 (0.11)	21 (0.23)	2.79 (1.45-5.37) 0.0021	2.43 (1.14-5.14) 0.0203
T carrier			1.5 (0.92-2.74) 0.0900	1.49 (0.83-2.68) 0.1737
	n=374	n=90		

SNP rs1800871	HIV coinfection excluded.			
	Controls	Case	OR (95% CI) p-value	OR (95% CI) p-value ^a
C	0.66	0.57	*	*
T	0.34	0.43	1.52 (0.90-2.56) 0.1142	1.42 (0.80-2.52) 0.2221
CC	166 (0.44)	23 (0.33)	*	*
CT	165 (0.44)	32 (0.46)	1.39 (0.78-2.49) 0.2537	1.34 (0.72-2.51) 0.3432
TT	43 (0.11)	14 (0.20)	2.34 (1.11-4.94) 0.0245	2.07 (0.90-4.78) 0.0862
T carrier			1.59 (0.92-2.74) 0.0900	1.49 (0.83-2.68) 0.1737
	n=374	n=69		

Abbreviation: OR - *odds ratio*; CI - confidence interval of 95%.

^a Logistic regression analyzes, OR and p-value were adjusted for covariates sex and ethnicity.

*Indicates the baseline for comparison

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. World Health Organization [Internet]. Leishmaniasis. [Citado em 09 de janeiro de 2017] Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
2. Pan American Health Organization [Internet] LEISHMANIASIS - **World Health Day**. [Citado em 09 de janeiro de 2017. Disponível em: <http://www.paho.org/world-health-day-2014/wp-content/uploads/2014/02/leishmaniasis.pdf?ua=1>.
3. Gontijo, CMF; Melo M. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7:338–49.
4. DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório de *L. donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. *Hospital*. 1955 (48) p.61-76.
5. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004 Sep;27(5):305-18. Review. PubMed PMID: 15225981.
6. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Dec;100(8):811-27. Epub 2006 Jan 20. Review. PubMed PMID: 16444411.
7. Lutz A, Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1912;4(1):84-95.
8. Cunha, AM.; Chagas, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *O Hospital*. 1937 6(2):5-9.

9. Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2010;1(2):13–32.
10. Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD, Barazarte R, Travi BL, Lane RP. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Trop*. 2003 Jan;85(1):19-29. PubMed PMID: 12505180.
11. de Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop*. 2008 Jul;107(1):66-9. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.04.015. Epub 2008 Apr 25. PubMed PMID: 18502392.
12. Carvalho MR, Valença HF, da Silva FJ, de Pita-Pereira D, de Araújo Pereira T, Britto C, et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (Franca, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop*. 2010;116(1):108–10
13. Salomón OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz DV. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Trop*. 2010 Jan;113(1):84-7. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.08.024. Epub 2009 Aug 28. PubMed PMID: 19716797.
14. Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Feb;101(1):117-8; discussion 118. Epub 2006 May 12. PubMed PMID: 16699722.

15. Brito ME, Silva CJ, Silva CM, Salazar PR, Coutinho JS, Reis Lde C et al. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2008 Oct;24(10):2445-8. PubMed PMID: 18949246.
16. Camargo-Neves VL, Neves VC-. Publicação Mensal sobre Agravos à Saúde Pública. *Bol Epidemiológico Paul*. 2007;4(48):1-4.
17. Guerra JA, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM. Clinical and diagnostic aspects of American tegumentary leishmaniasis in soldiers simultaneously exposed to the infection in the Amazon Region. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36(5):587-90.
18. Dostálová A, Volf P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*. 2012 Dec 3;5:276. doi: 10.1186/1756-3305-5-276. Review. PubMed PMID: 23206339; PubMed Central PMCID: PMC3533922.
19. Ortiz RC, Anversa L. Epidemiologia da leishmaniose visceral em Bauru, São Paulo, no período de 2004 a 2012: um estudo descritivo. *Epidemiol e Serviços Saúde [Internet]*. 2015;24(1):97-104.
20. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Jul 11;9(8):604-15. doi: 10.1038/nrmicro2608. Review. PubMed PMID: 21747391.
21. Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. *Curr Mol Med*. 2004 Sep;4(6):601-9. Review. PubMed PMID: 15357211.
22. Naderer T, McConville MJ. Intracellular growth and pathogenesis of Leishmania parasites. *Essays Biochem*. 2011;51:81-95. doi: 10.1042/bse0510081. Review. PubMed PMID: 22023443.

23. Topno RK, Das VNR, Ranjan A, Pandey K, Singh D, Kumar N, et al. Asymptomatic Infection with Visceral Leishmaniasis in a Disease-Endemic Area in Bihar , India. 2010;83(3):502–6. Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2015 Jul 4;9(6):588-96. doi: 10.3855/jidc.6833. Review. PubMed PMID: 26142667.
24. Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(6):588–96.
25. Cardim MFM, Vieira CP, Chiaravalloti-Neto F. Spatial and spatio temporal occurrence of human visceral leishmaniasis in Adamantina, State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):716–23.
26. Conti RV, Moura Lane VF, Montebello L, Pinto Junior VL. Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. *J Vector Borne Dis*. 2016 Apr-Jun;53(2):99-104. Review. PubMed PMID: 27353578.
27. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília (DF). 2003.
28. Oliveira AM, Guirado MM, Dibo MR, Rodas LAC, Bocchi MR, Chiaravalloti-Neto F, et al. Occurrence of *Lutzomyia longipalpis* and human and canine cases of visceral leishmaniasis and evaluation of their expansion in the Northwest region of the State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(1):41–50.
29. Paiva-cavalcanti M De, Carla R, Morais S De, Pessoa-e-silva R, Trajano-silva LAM, Gonçalves-de-albuquerque SC, et al. Leishmaniases diagnosis : an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci* [Internet]. 2015;1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>

30. Marzochi MCDA, Fagundes A, Andrade MV De, Souza MB de, Madeira Ma de F, Mouta-Confort E, et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro , Brazil : eco-epidemiological aspects and control Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro , Brasil : aspectos eco-epidemiológicos e controle. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(5):570–80.
31. Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiara-valloti-Neto F. Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil, 1999-2011. *Rev Saude Publica.* 2013;47(4):691–700.
32. Cardim MFM, Vieira CP, Chiaravalloti-Neto F. Spatial and spatiotemporal occurrence of human visceral leishmaniasis in Adamantina, State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(6):716–23.
33. Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EAB, et al. Canine Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS One.* 2016;11(7).
34. Prefeitura Municipal de Bauru [Internet]. Atualização em Leishmaniose Visceral. [Acesso em 20/12/16] Disponível em: http://www.bauru.sp.gov.br/arquivos2/arquivos_site/sec_saude/dsc/2013/VE;1;2013-08-22;Leishmaniose_Visceral_a._Atualiza%C3%A7%C3%A3o_epidemiol%C3%B3gica.pdf.
35. de Souza VAF, Cortez LRPB, Dias RA, Amaku M, Neto JSF, Kuroda RBS, et al. Space-time cluster analysis of American visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo State, Brazil *Cad Saude Publica.* 2012;28(10):1949–64.
36. Mescouto-Borges MRM, Maués É, Costa DL, da Silva Pranchevicius MC, Romero GAS. Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: Report of two Brazilian human cases. *Brazilian J Infect Dis.* 2013;17(2):263–6.

37. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1561-77. Review. PubMed PMID: 16257344.
38. Dedet JP, Pratlong F. Leishmaniasis. In: Cook G, Alimuddin IZ, editors. *Manson's Tropical Diseases*. 22nd ed. London, England: Saunders; 2009. pp. 1341–13
39. Diniz LM, Duani H, Freitas CR, Figueiredo RM, Xavier CC. Neurological involvement in visceral leishmaniasis: case report. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Nov-Dec;43(6):743-5.
40. Abass E, Kang C, Martinkovic F, Semiro-Santos SJ, Sundar S, Walden P, et al. Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: Comparison of different serological tests in three endemic regions. *PLoS One* 2015;10(3):1–13.
41. Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis*. 2016 Mar;53(1):8-16. Review. PubMed PMID: 27004573.
42. Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2014 Aug 13;8(8):961-72. doi: 10.3855/jidc.4310. Review. PubMed PMID: 25116660.
43. Sundar S, Sahu M, Mehta H, Gupta A, Kohli U, Rai M, Berman JD et al. Non invasive management of Indian visceral leishmaniasis: clinical application of diagnosis by K39 antigen strip testing at a kala-azar referral unit. *Clin Infect Dis*. 2002 Sep 1;35(5):581-6. Epub 2002 Jul 31. PubMed PMID: 12173133.
44. Maia Z, Mistro S, Mendes CMC, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(1).

45. Moreno EC, Melo MN, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade ASR, Antunes CMF, et al. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais , using serological and molecular biology techniques . *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(5):421–7.
46. Verma S, Singh R, Sharma V, Bumb RA, Negi NS, Ramesh V, Salotra P. Development of a rapid loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis and assessment of cure of Leishmania infection. *BMC Infect Dis.* 2017 Mar 23;17(1):223. doi: 10.1186/s12879-017-2318-8. PubMed PMID: 28335752; PubMed Central PMCID: PMC5363003.
47. Griensven J Van, Zijlstra EE, Hailu A. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection : Time for Concerted Action. 2014;8(8):1–2.
48. Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury AN, Romero GA et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Sep 18;8(9):e3136. doi: 10.1371/journal.pntd.0003136. eCollection 2014 Sep. Review. PubMed PMID: 25233461; PubMed Central PMCID: PMC4169383.
49. Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(5):e1665. doi: 10.1371/journal.pntd.0001665. Epub 2012 May 29. Review. PubMed PMID: 22666514; PubMed Central PMCID: PMC3362615.
50. Ministério da Saúde. Manual de Recomendação para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento para Pacientes com Coinfecção Leishmania/HIV. Brasília (DF), 2011.
51. Wolday D, Berhe N, Akuffo H, Britton S. Leishmania-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. *Parasitol Today.* 1999 May;15(5):182-7. Review. PubMed PMID: 10322351.

52. Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Aug 21;8(8):e3021. doi: 10.1371/journal.pntd.0003021. eCollection 2014 Aug. Review. PubMed PMID: 25144380; PubMed Central PMCID: PMC4140663.
53. Diro E, van Griensven J, Mohammed R, Colebunders R, Asefa M, Hailu A, Lynen L. Atypical manifestations of visceral leishmaniasis in patients with HIV in north Ethiopia: a gap in guidelines for the management of opportunistic infections in resource poor settings. *Lancet Infect Dis*. 2015 Jan;15(1):122-9. doi: 10.1016/S1473 3099(14)70833-3. Epub 2014 Oct 7. PubMed PMID: 25300862.
54. Ministério da saúde. *Leishmaniose Visceral*. Brasilia (DF), 2013.
55. Martins-Melo FR, Lima Mda S, Alencar CH, Ramos AN Jr, Heukelbach J. Epidemiological patterns of mortality due to visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection in Brazil, 2000-2011. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014 Jun;108(6):338-47. doi: 10.1093/trstmh/tru050. Epub 2014 Apr 4. PubMed PMID: 24706340.
56. Orsini M, Canela JR, Disch J, Maciel F, Greco D, Toledo A Jr, Rabello A. High frequency of asymptomatic *Leishmania* spp. Infection among HIV-infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012 May;106(5):283-8. doi: 10.1016/j.trstmh.2012.01.008. Epub 2012 Feb 18. PubMed PMID: 22348817.
57. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Apr;21(2):334-59, table of contents. doi: 10.1128/CMR.00061-07. Review. PubMed PMID: 18400800; PubMed Central PMCID: PMC2292576.

58. Ezra N, Ochoa MT, Craft N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.* 2010 Sep;2(3):248-57. doi: 10.4103/0974-777X.68528. PubMed PMID: 20927287; PubMed Central PMCID: PMC2946682.
59. Sinha PK, van Griensven J, Pandey K, Kumar N, Verma N, Mahajan R et al. Liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-coinfected patients: 2-year treatment outcomes in Bihar, India. *Clin Infect Dis.* 2011 Oct;53(7):e91-8. doi: 10.1093/cid/cir521. PubMed PMID: 21890763.
60. Mahajan R, Das P, Isaakidis P, Sunyoto T, Sagili KD, Lima MA et al. Combination Treatment for Visceral Leishmaniasis Patients Coinfected with Human Immunodeficiency Virus in India. *Clin Infect Dis.* 2015 Oct 15;61(8):1255-62. doi: 10.1093/cid/civ530. Epub 2015 Jun 30. PubMed PMID: 26129756; PubMed Central PMCID: PMC4583582.
61. Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral: Recomendações clínicas para para redução da letalidade. Brasília (DF). 2014
62. Melaku Y, Collin SM, Keus K, Gatluak F, Ritmeijer K, Davidson RN. Treatment of kala-azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: a retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Jul;77(1):89-94. PubMed PMID: 17620635.
63. Musa A, Khalil E, Hailu A, Olobo J, Balasegaram M, Omollo R et al. Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(6):e1674. doi: 10.1371/journal.pntd.0001674. Epub 2012 Jun 19. PubMed PMID: 22724029; PubMed Central PMCID: PMC3378617.

64. Sundar S, Sinha PK, Rai M, Verma DK, Nawin K, Alam S et al. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet*. 2011 Feb 5;377(9764):477-86. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62050-8. Epub 2011 Jan 20. PubMed PMID: 21255828.
65. Rahman R, Goyal V, Haque R, Jamil K, Faiz A, Samad R et al. Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 May 30;11(5):e0005635. doi: 10.1371/journal.pntd.0005635. eCollection 2017 May. PubMed PMID: 28558062; PubMed Central PMCID: PMC5466346.
66. Musa A, Khalil E, Hailu A, Olobo J, Balasegaram M, Omollo R, Edwards T Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6):e1674. doi: 10.1371/journal.pntd.0001674. Epub 2012 Jun 19. PubMed PMID: 22724029; PubMed Central PMCID: PMC3378617.
67. A.M.Musa, E.A.G.Khalil, F.A.E.Mahgoub et al., "Immunochemotherapy of persistent post-kala-azar dermal leishmaniasis: a novel approach to treatment," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* vol.102,no.1,pp.58–63, 2008
68. Sakthianandeswaren A, Foote SJ, Handman E. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2009 Aug;25(8):383-91. doi:10.1016/j.pt.2009.05.004. Epub 2009 Jul 18. Review. PubMed PMID: 19617002.
69. Shio MT, Hassani K, Isnard A, Ralph B, Contreras I, Gomez MA, et al. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. *J Trop Med*. 2012;2012.

70. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):373-84. doi: 10.1038/ni.1863. Epub 2010 Apr 20. Review. PubMed PMID: 20404851.
71. Faria MS, Reis FCG, Lima APCA. Toll-like receptors in Leishmania infections: Guardians or promoters? *J Parasitol Res.* 2012;2012.
72. Kavooosi G, Ardestani SK, Kariminia A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to Leishmania major phosphoglycans (PGs). *Parasitology.* 2009 Sep;136(10):1193-9. doi: 10.1017/S0031182009990473. Epub 2009 Jul 27. PubMed PMID: 19631014.
73. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.* 2005 Feb 4;307(5710):731-4. PubMed PMID: 15692051.
74. van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, Muller FJ, Hommes DW, Zaat AS et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity.* 2007 Oct;27(4):660-9. Epub 2007 Oct 4. PubMed PMID: 17919942.
75. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006 Mar;6(3):173-82. Review. PubMed PMID: 16498448
76. Peters N, Sacks D. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006 Oct;213:159-79. Review. PubMed PMID: 16972903.
77. Mollinedo F, Janssen H, de la Iglesia-Vicente J, Villa-Pulgarin JA, Calafat J. Selective fusion of azurophilic granules with Leishmania-containing phagosomes in human neutrophils. *J Biol Chem.* 2010 Nov 5;285(45):34528-36. doi: 10.1074/jbc.M110.125302. Epub 2010 Aug 26. PubMed PMID: 20801889; PubMed Central PMCID: PMC2966068.

78. Rousseau D, Demartino S, Ferrua B, François J, Anjuère F, Fragaki K, et al. *Leishmania infantum* infection. 2001;(VI).
79. Cooper PR, Palmer LJ, Chapple IL. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? *Periodontol 2000*. 2013 Oct;63(1):165-97. doi: 10.1111/prd.12025. Review. PubMed PMID: 23931060.
80. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5. PubMed PMID: 15001782.
81. Abbas A. *Imunologia Básica*. 3ed. São Paulo. Elsevier. 2009.
82. Romagnani S. Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996 Sep;80(3 Pt 1):225-35. Review. PubMed PMID: 88112.
83. Atta AM, D'Oliveira, Correa J, Atta ML, Almeida RP, Carvalho EM. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Sep;59(3):426-30. PubMed PMID: 9749638.
84. Nascimento MDDSB, Bezerra GFDB, Bandeira Neto AP, Silva LM Da, Bezerra JDM, Viana GMDC. Comparative study about the specific anti-leishmania of immunoglobulin G and E as markers of infection and illness among dwellers of a visceral leishmaniasis endemic area in São Luis, MA. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(1):38–42.
85. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:495-521. Review. PubMed PMID: 9597139.
86. Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett*. 2005 Jun 15;99(1):17-23. Epub 2005 Feb 17. Review. PubMed PMID: 15894106.
87. Kane M, Mosser D. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. *J Immunol*. 2001;166:1141–7.

88. Ansari NA, Saluja S, Salotra P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin Immunol.* 2006;119(3):339–45.
89. Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, Brodskyn C, Costa J, Barral-Netto M, Barral A. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis.* 2005 Dec 19;5:113. PubMed PMID: 16364177; PubMed Central PMCID: PMC1343567.
90. Gautam S, Kumar R, Maurya R, Nylén S, Ansari N, Rai M, Sundar S, Sacks D. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2011 Oct 1;204(7):1134-7. doi: 10.1093/infdis/jir461. PubMed PMID: 21881130; PubMed Central PMCID: PMC3164427.
91. Johnston CJ, Smyth DJ, Dresser DW, Maizels RM. TGF- β in tolerance, development and regulation of immunity. *Cell Immunol.* 2016 Jan;299:14-22. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.10.006. Epub 2015 Nov 23. PubMed PMID: 26617281; PubMed Central PMCID: PMC4711336.
92. Wilson ME, Young BM, Davidson BL, Mente KA, McGowan SE. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 1998 Dec 1;161(11):6148-55. PubMed PMID: 9834100.
93. Pitta MGR, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. 2009;119(8).
94. Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Júnior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie MS, de Jesus A, de Almeida RP, da Silva JS. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. *J Infect Dis.* 2015 Mar 15;211(6):1015-26. doi: 10.1093/infdis/jiu531. Epub 2014 Oct PubMed PMID: 25274569.

95. Sheel M, Beattie L, Frame TC, de Labastida Rivera F, Faleiro RJ, Bunn PT et al. IL-17A-Producing $\gamma\delta$ T Cells Suppress Early Control of Parasite Growth by Monocytes in the Liver. *J Immunol.* 2015 Dec 15;195(12):5707-17. doi: 10.4049/jimmunol.1501046. Epub 2015 Nov 4. PubMed PMID: 26538396.
96. Quirino GFS, Nascimento MSL, Davoli-Ferreira M, Sacramento LA, Lima MHF, Almeida RP, et al. Interleukin-27 (IL-27) mediates susceptibility to visceral leishmaniasis by suppressing the IL-17-neutrophil response. *Infect Immun.* 2016;84(8):2289–98.
97. Brain O, Owens BM, Pichulik T, Allan P, Khatamzas E, Leslie A et al. The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. *Immunity.* 2013 Sep 19;39(3):521-36. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.035. PubMed PMID: 24054330.
98. Nascimento MS, Ferreira MD, Quirino GF, Maruyama SR, Krishnaswamy JK, Liu D, Berlink et al. NOD2-RIP2-Mediated Signaling Helps Shape Adaptive Immunity in Visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2016 Dec 1;214(11):1647-1657. Epub 2016 Sep 20. PubMed PMID: 27651416.
99. Gabriel C, McMaster WR, Girard D, Descoteaux A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J Immunol.* 2010 Oct 1;185(7):4319-27. doi: 10.4049/jimmunol.1000893. Epub 2010 Sep 8. PubMed PMID: 20826753.
100. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 2003 May;11(5):210-4. PubMed PMID: 12781523.
101. Cotterell SEJ, Engwerda CR, Kaye PM. Enhanced Hematopoietic Activity Accompanies Parasite Expansion in the Spleen and Bone Marrow of Mice Infected with *Leishmania donovani* Enhanced Hematopoietic Activity Accompanies Parasite Expansion in the Spleen and Bone Marrow of Mice Infected with *Leish.* *Infect Immun.* 2000;68(4):1840–8.

102. Antoine JC, Prina E, Courret N, Lang T. Leishmania spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Adv Parasitol.* 2004;58:1-68. Review. PubMed PMID: 15603761.
103. Chang KP, Reed SG, McGwire BS, Soong L. Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop.* 2003 Mar;85(3):375-90. Review. PubMed PMID: 12659975.
104. Huynh C, Andrews NW. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of Leishmania. *Cell Microbiol.* 2008;10(2):293–300.
105. Swenerton RK, Zhang S, Sajid M, Medzihradzky KF, Craik CS, Kelly BL, McKerrow JH. The oligopeptidase B of Leishmania regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem.* 2011 Jan 7;286(1):429-40. doi: 10.1074/jbc.M110.138313. Epub 2010 Oct 20. PubMed PMID: 20961853; PubMed Central PMCID: PMC3013002.
106. Alcaïs A, Abel L, Casanova JL. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *J Clin Invest.* 2009 Sep;119(9):2506-14. doi: 10.1172/JCI38111. Review. PubMed PMID: 19729848; PubMed Central PMCID: PMC2735901.
107. Pasteur, L. 1939. *Oeuvres de Pasteur, réunies et annotées par Louis Pasteur Vallery-Radot.* Masson et Cie. Paris, France.
108. Allison, A.C. 1954. Protection afforded by sickle cell trait against subtertian malarial infection. *Br. Med. J.* 1:290
109. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev.* 2006 Sep;77(3):189-202. Review. PubMed PMID: 17171999.
110. Kallmann FJ, Reisner D. 1943. Twin studies on the significance of genetic factors in tuberculosis. *Am. Rev. Tuberc.* 47, 549–574
111. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Ver Genet.* 2001 Feb;2(2):91-9. Review. PubMed PMID: 11253062.

112. Prevedello FC, Mira MT. Leprosy : a genetic disease ? 82(5).
113. Pacheco AG, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers*. 2009;27(3):173-86. doi: 10.3233/DMA-2009-0654. Review. PubMed PMID: 19893211; PubMed Central PMCID: PMC3835071.
114. Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol*. 2009;578:23-39. doi: 10.1007/978-1-60327-411-1_2. Review. PubMed PMID: 19768585.
115. Yang F. Genetic variant RS 1058240 at the microRNA-binding site in the GATA3 gene may regulate its mRNA expression. *Biomedical Reports*., 2014(2):404-407, 2014.
116. Alvarado-Navarro A, Montoya-Buelna M, Muñoz-Valle JF, López-Roa RI,
117. Guillén-Vargas C, Fafutis-Morris M. The 3'UTR 1188 A/C polymorphism in the interleukin-12p40 gene (IL-12B) is associated with lepromatous leprosy in the west of Mexico. *Immunol Lett*. 2008 Jun 30;118(2):148-51. doi: 10.1016/j.imlet.2008.03.015. Epub 2008 Apr 28. PubMed PMID: 18485489.
118. Bucheton B, Abel L, El-Safi S, Kheir MM, Pavék S, Lemainque A, Dessein AJ. A major susceptibility locus on chromosome 22q12 plays a critical role in the control of kala-azar. *Am J Hum Genet*. 2003 Nov;73(5):1052-60. Epub 2003 Oct 13. PubMed PMID: 14557985; PubMed Central PMCID: PMC1180485.
119. Bucheton B, Argiro L, Chevillard C, Marquet S, Kheir MM, Mergani A, El-Safi SH, Dessein AJ. Identification of a novel G245R polymorphism in the IL-2 receptor beta membrane proximal domain associated with human visceral leishmaniasis. *Genes Immun*. 2007 Jan;8(1):79-83. Epub 2006 Nov 16. PubMed PMID: 17108990.

120. Mohamed HS, Ibrahim ME, Miller EN, Peacock CS, Khalil EA, Cordell HJ et al. Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan: linkage and association with IL4 and IFNGR1. *Genes Immun.* 2003 Jul;4(5):351-5. PubMed PMID: 12847550.
121. Miller EN, Fadl M, Mohamed HS, Elzein A, Jamieson SE, Cordell HJ, et al. Y chromosome lineage- and village-specific genes on chromosomes 1p22 and 6q27 control visceral leishmaniasis in Sudan. *PLoS Genet.* 2007;3(5):679–88.
122. Jamieson SE, Miller EN, Peacock CS, Fakiola M, Wilson ME, Bales-Holst A et al. Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. *Genes Immun.* 2007 Jan;8(1):84-90. Epub 2006 Nov 23. PubMed PMID: 17122780; PubMed Central PMCID: PMC2495017.
123. Jamieson SE, Miller EN, Peacock CS, Fakiola M, Wilson ME, Bales-Holst A et al. Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. *Genes Immun.* 2007 Jan;8(1):84-90. Epub 2006 Nov 23. PubMed PMID: 17122780; PubMed Central PMCID: PMC2495017.
124. Fakiola M, Miller EN, Fadl M, Mohamed HS, Jamieson SE, Francis RW, et al. Genetic and functional evidence implicating DLL1 as the gene that influences susceptibility to visceral leishmaniasis at chromosome 6q27. *J Infect Dis.* 2011;204(3):467–77.
125. Jesus Fernandes Covas C, Cardoso CC, Gomes-Silva A, Santos Oliveira JR, Da-Cruz AM, Moraes MO. Candidate gene case-control and functional study shows macrophage inhibitory factor (MIF) polymorphism is associated with cutaneous leishmaniasis. *Cytokine.* 2013 Jan;61(1):168-72.
126. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 1995 Nov 1;182(5):1259-64.

127. Ajdary S, Ghamilouie MM, Alimohammadian MH, Riazi-Rad F, Pakzad SR. Toll-like receptor 4 polymorphisms predispose to cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect.* 2011 Mar;13(3):226-31.
128. Kamali-sarvestani E, Rasouli M, Mortazavi H. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. *2006*;35:159–65.
129. Castellucci L, Jamieson SE, Almeida L, Oliveira J, Guimarães LH, Lessa M, Fakiola M, Jesus AR, Nancy Miller E, Carvalho EM, Blackwell JM. Wound healing genes and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2012 Jul;12(5):1102-10.
130. Fernández-Figueroa, E. A., Rangel-Escareño, C., Espinosa-Mateos, V., Carrillo-Sánchez, K., Salaiza-Suazo, N., Carrada-Figueroa, G., ... Becker, I. (2012). Disease Severity in Patients Infected with *Leishmania mexicana* Relates to IL-1 β . *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(5), e1533.
131. Hajilooi M, Ahmadi A, Lotfi P, Matini M, Jafari D, Bazmani A, Momeni M. Is the polymorphism at position -1082 of IL-10 gene associated with visceral leishmaniasis? *Iran J Public Health.* 2014 Aug;43(8):1107-12. PubMed PMID:25927040; PubMed Central PMCID: PMC4411907.
132. Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, Sertorio M, Rafati S, Chevillard C, Prata A, Alcaïs A, Argiro L, Dessein A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol.* 2008 May1;180(9):6139-48. PubMed PMID: 18424735.
133. Kumar D, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S. Association of interleukin-18 gene polymorphism with susceptibility to visceral leishmaniasis in endemic area of Bihar, an Indian population. *ScientificWorldJournal.*

2014;2014:852104. doi:10.1155/2014/852104. Epub 2014 Oct 22. PubMed PMID: 25405235; PubMed CentralPMCID: PMC4227453

134. Hajilooi M, Abasi M, Bazmani A, Ahmadi A, Matini M, Solgi G, Sardarian K. Evaluation of interleukin-8 -251 t/a polymorphisms in visceral leishmaniasis. *J Res Health Sci.* 2015 Winter;15(1):59-61.
135. Jeronimo SMB, Holst AKB, Jamieson SE, Francis R, Martins R a, Ettinger N, et al. UKPMC Funders Group Genes at Human Chromosome 5q31. 1 Regulate Delayed Type Hypersensitivity Responses Associated with *Leishmania chagasi* Infection. 2008;8(7):539–51.
136. Kouriba B, Chevillard C, Bream JH, Argiro L, Dessein H, Arnaud V et al. Analysis of the 5q31-q33 locus shows an association between IL13-1055C/T IL- 13-591A/G polymorphisms and *Schistosoma haematobium* infections. *J Immunol.* 2005 May 15;174(10):6274-81. PubMed PMID: 15879126.
137. Fakiola M, Strange A, Cordell HJ, Miller EN, Pirinen M, Su Z et al. Common variants in the HLA-DRB1-HLA-DQA1 HLA class II region are associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. *Nat Genet.* 2013 Feb;45(2):208-13. doi: 10.1038/ng.2518. Epub 2013 Jan 6. PubMed PMID: 23291585; PubMed Central PMCID: PMC3664012.
138. Landes MB, Rajaram MV, Nguyen H, Schlesinger LS. Role for NOD2 in *Mycobacterium tuberculosis*-induced iNOS expression and NO production in human macrophages. *J Leukoc Biol.* 2015 Jun;97(6):1111-9. doi: 10.1189/jlb.3A1114-557R. Epub 2015 Mar 23. PubMed PMID: 25801769; PubMed Central PMCID: PMC4438743.
139. Sales-Marques C, Salomão H, Fava VM, Alvarado-Arnez LE, Amaral EP et al. NOD2 and CCDC122-LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians. *Hum Genet.* 2014 Dec;133(12):1525-32. doi: 10.1007/s00439-014-1502-9. Epub 2014 Nov 4. PubMed PMID: 25367361.

140. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Raj B, Janer M, Hagge DA, et al. NIH Public Access. 2011;201(9):1422–35.
141. Marques C de S, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LT, Martins JH, Amaral EP et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis.* 2013 Jul;208(1):120-9. doi: 10.1093/infdis/jit133. Epub 2013 Apr 1. PubMed PMID: 23547143.
142. Schurz H, Daya M, Möller M, Hoal EG, Salie M. TLR1, 2, 4, 6 and 9 Variants Associated with Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015 Oct 2;10(10):e0139711. doi: 10.1371/journal.pone.0139711. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 26430737; PubMed Central PMCID: PMC4592262
143. Marques C de S, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LT, Martins JH, Amaral EP et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis.* 2013 Jul;208(1):120-9. doi: 10.1093/infdis/jit133. Epub 2013 Apr 1. PubMed PMID: 23547143.
144. Sacramento LA, da Costa JL, de Lima MHF, et al. Toll-Like Receptor 2 Is Required for Inflammatory Process Development during *Leishmania infantum* Infection. *Frontiers in Microbiology.* 2017;8:262. doi:10.3389/fmicb.2017.00262. Ejghal R, Hida M, Bennani ML, Meziane M, Aurag R, Lemrani M. The TLR2 and TLR4 gene polymorphisms in Moroccan visceral leishmaniasis patients. *Acta Trop.* 2016;158:77–82.
145. Johnson CM, Lyle EA, Omuetti KO, Stepensky VA, Yegin O, Alpsoy E, Hamann L, Schumann RR, Tapping RI. Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol.* 2007 Jun 15;178(12):7520-4. PubMed PMID: 17548585.

146. Santana NL, Rêgo JL, Oliveira JM, Almeida LF, Braz M, Machado LM, Machado PR, Castellucci LC. Polymorphisms in genes TLR1, 2 and 4 are associated with differential cytokine and chemokine serum production in patients with leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017 Apr;112(4):260-268. doi: 10.1590/0074-02760160366. Epub 2017 Mar 2. PubMed PMID: 28327786; PubMed Central PMCID: PMC5354609.
147. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, Khor CC et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog*. 2010 Jul 1;6:e1000979. doi: 10.1371/journal.ppat.1000979. PubMed PMID: 20617178; PubMed Central PMCID: PMC2895660.
148. Ke Z, Yuan L, Ma J, Zhang X, Guo Y, Xiong H. IL-10 Polymorphisms and Tuberculosis Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. *Yonsei Med J*. 2015 Sep;56(5):1274-87. doi: 10.3349/ymj.2015.56.5.1274. PubMed PMID: 26256970; PubMed Central PMCID: PMC4541657.
149. Upperman JS, Pillage G, Siddiqi MQ, Zeevi A, Kelly N, Ford HR, Kammerer C, Spolarics Z. Dominance of high-producing interleukin 6 and low-producing interleukin 10 and interferon gamma alleles in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient trauma patients. *Shock*. 2005 Mar;23(3):197-201. PubMed PMID: 15718915.
150. Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IM, Parelli FP et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun*. 2009 Mar;10(2):174-80. doi: 10.1038/gene.2008.97. Epub 2008 Dec 25. PubMed PMID: 19110537

