

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

BEATRIZ COUTINHO DE OLIVEIRA

**Avaliação de Isotipos de Imunoglobulinas por Citometria de Fluxo para
Diagnóstico e Critério de Cura na Leishmaniose Tegumentar Americana**

Recife

2016

BEATRIZ COUTINHO DE OLIVEIRA

Avaliação de Isotipos de Imunoglobulinas por Citometria de Fluxo para Diagnóstico e Critério de Cura na Leishmaniose Tegumentar Americana

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica, sob orientação de Dra. Valéria Pereira Hernandez e coorientação de Dra. Andresa Pereira de Oliveira Mendes e Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro.

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Oliveira, Beatriz Coutinho de
Avaliação de isotipos de imunoglobulinas por citometria de fluxo
para diagnóstico e critério de cura na leishmaniose tegumentar
americana/ Beatriz Coutinho de Oliveira – Recife: O Autor, 2016.

96 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Valéria Pereira Hernandez

Coorientadoras: Andresa Pereira de Oliveira Mendes e Maria
Carolina Accioly Brelaz de Castro

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. Centro de Biociências. Inovação Terapêutica,
2016.

Inclui referências e apêndices

- 1. Leishmaniose 2. Citometria de fluxo 3. Diagnóstico I.**
Hernandes, Valéria Pereira (orientadora) II. Oliveira, Andresa Pereira
de (coorientadora) III. Castro, Carolina Accioly Brelaz de
(coorientadora) IV. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-146

BEATRIZ COUTINHO DE OLIVEIRA

Avaliação de Isotipos de Imunoglobulinas por Citometria de Fluxo para Diagnóstico e Critério de Cura na Leishmaniose Tegumentar Americana

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica, sob orientação da Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandes e coorientação de Dra. Andresa Pereira de Oliveira Mendes e Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro.

Aprovada em: 25/02/2016

Banca Examinadora

Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandes/CPqAM-FIOCRUZ

Profa. Dra. Máira Galdino da Rocha Pitta/UFPE

Prof. Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues/CPqAM-FIOCRUZ

Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra/UFPE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado saúde e forças para continuar, mesmo diante de todos os problemas que surgiram no meio do caminho. Existem momentos em que só a fé é capaz de revigorar nossas forças, e graças a Ele e à espiritualidade amiga consegui chegar até aqui;

Aos meus pais e meu irmão, por serem a base da minha vida. Por colocarem amor em tudo que fazem por mim, por sempre apoiarem nos momentos difíceis e por torcerem com minhas conquistas;

Aos meus avós paternos (*in memoriam* Joaquim) e Íris;

Aos meus avós maternos (*in memoriam* Carmen e Abílio), sei que aí de "cima" vocês estão me acompanhando. Saudades!

À toda minha família. Tios, primos e primas, que embora não seja possível sempre estar em contato, sei que só desejam meu bem;

Ao meu namorado, Rodrigo, por todo o amor, carinho e cumplicidade. Por me amparar nos momentos difíceis, me dando forças para continuar. Também pelas dicas de formatação, apresentação e referências. Obrigada, meu amor!

Aos meus queridos amigos do Colégio Atual Piedade: Diego, Bleinat, Luiz, Jader e Rafael por serem tão especiais, e arrancarem meus sorrisos mesmo nos momentos de raiva;

Ao trio do meu coração: Gabriela, Katharina e Rayanne. A amizade de vocês significa demais para mim! Obrigada por compartilharem tantos momentos incríveis comigo e por serem o apoio umas das outras naqueles mais complicados;

Aos meus amigos do GEFA que vibram por mim e sempre têm uma palavra amiga de consolo e apoio. Obrigada pelos momentos de ensinamento e de descontração!

Agradeço, também, minha orientadora Valéria Pereira. Obrigada por ser essa grande pessoa (quase mãe em alguns momentos) amiga, que nos orienta da melhor forma possível. Obrigada pelos ensinamentos e por me ajudar a crescer como pesquisadora;

Às minhas coorientadoras: Andresa Mendes e Carolina Castro. Sem vocês, essa dissertação não teria saído! Andresa, muito obrigada por sempre me ajudar nos experimentos, por ficar até tarde me aguentando e por me dar tantas dicas boas para colocar nos trabalhos. Carol, obrigada por sempre corrigir tão rápido e com tanta pertinência meus relatórios, artigos e essa dissertação. Com a sua ajuda, sempre tenho a certeza de que a qualidade dos trabalhos será bem melhor;

Aos meus colegas e amigos do laboratório: Rafael, Aline, Thiago, Allana, Ailton, Elis, Diego e Lucas. Trabalhar com vocês é sempre divertido. Elis, obrigada e desculpa pelas altas horas no citômetro! Agradeço também a Marina, Thays e Amanda, que já saíram do laboratório, mas continuam presentes (nas fotos) e nos nossos corações!

Aos colegas do departamento de Imunologia, especialmente a Edi, por colaborar conosco junto ao Serviço de Referências em Leishmanioses;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por ceder a infraestrutura e os equipamentos necessários para a realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) pelo conhecimento agregado nas disciplinas e ao secretário Paulo por prontamente tirar minhas dúvidas e responder rápido meus e-mails. Obrigada, Paulo!

À CAPES pela concessão da bolsa;

À todos aqueles que porventura não foram aqui mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse desenvolvido.

*"Não existe verdadeira inteligência sem
bondade".*

Ludwig Van Beethoven.

RESUMO

O tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta limitações por ser tóxico, podendo causar efeitos adversos nos pacientes, e também, por não existir um critério de cura efetivo, que atualmente é realizado apenas clinicamente, visualizando a completa cicatrização da lesão. Além dos desafios socioeconômicos que agravam a doença, o seu diagnóstico apresenta dificuldades, pois além de haver a necessidade de realizar associações entre os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos pacientes para se chegar a um resultado definitivo, os testes laboratoriais convencionais apresentam limitações. O objetivo do trabalho foi avaliar a aplicabilidade dos isotipos de imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) por citometria de fluxo para o diagnóstico e critério de cura na leishmaniose tegumentar americana, e fazer um comparativo da citometria de fluxo em relação às técnicas convencionais: ELISA e Imunofluorescência Indireta. Foram utilizadas amostras de 14 pacientes, sobre as quais foram feitos os ensaios. Com relação aos resultados da comparação da citometria de fluxo, utilizando o anticorpo IgG, com a Imunofluorescência, foi visto que houve uma melhor acurácia do primeiro em relação ao segundo. Em comparação ao ELISA, a citometria também demonstrou ser um teste com melhor desempenho. Para a padronização dos isotipos IgG1, IgG2 e IgG3, foi observado que a melhor diluição do isotipo IgG1 para ser utilizada foi a diluição 1:400, para o isotipo IgG2, 1:100 e para o isotipo IgG3 1:200. Devido a baixa quantidade sérica circulante de IgG4 e pelo fato de ser mais encontrado em amostras de pacientes com a forma cutânea difusa (ausente em nosso Estado), não foi possível padronizar este isotipo. Na avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG1, foi observado que antes do tratamento, 36,8% dos pacientes foram negativos; nos pacientes um ano após o tratamento, 82,3%; dois anos após o tratamento, 27,2% e nos pacientes cinco anos após tratamento, 87,5%. Portanto, a análise global dos resultados obtidos sugere que a citometria de fluxo aplica-se ao rastreamento da LTA e que a utilização do isotipo IgG1 tem grandes possibilidades para contribuir como um método de diagnóstico mais específico do que os convencionais.

Palavras-chave: Leishmaniose. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Citometria de Fluxo. Imunoglobulina G. Isotipos. Diagnóstico.

ABSTRACT

The treatment for the American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) has limitations due to its toxicity, which can cause adverse effects on the patients; and also for not presenting an effective cure criterion, being currently performed by visualizing the complete healing of the lesion. Besides socio economical challenges which worsen the disease, the diagnosis shows difficulties because beyond the need to associate clinical, epidemiological and laboratorial aspects to achieve the definitive result, the conventional laboratorial tests are limited. Thereby, the objective of the study was to evaluate the applicability of immunoglobulin isotypes (IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4) by flow cytometry for the diagnosis and cure criterion of the American tegumentary leishmaniasis, comparing this tool with the conventional tests of ELISA and Indirect Immunofluorescence. 14 samples of patients were used for the assays. Regarding the results of the comparison between flow cytometry using anti-IgG antibodies with the indirect immunofluorescence, it was observed that the accuracy of the first test was higher than the second's. The same was observed when compared flow cytometry with ELISA. Regarding the standardization of the IgG isotypes 1, 2 and 3, it was seen that the best dilutions to work with were respectively 1:400, 1:100 and 1:200. Due to the low quantities of the IgG4 isotype in the sera and for the fact that it is found in samples of patients with the diffuse form (absent in the Northeastern Brazil), it was not possible to standardize. Evaluating the applicability of IgG1, we observed that before treatment 36,8% of the patients were negative, one year after treatment, 82,3%; two years after treatment, 27,2% and in patients five years after treatment, 87,5%. The global analysis of the obtained results suggests that flow cytometry can be used to screen ATL and that the use of IgG1 isotype has great chances of contributing as a more specific method than the conventional ones. More studies with IgG2 and IgG3 isotypes are necessary, raising the number of samples. However, this area still has good perspectives on the diagnosis and cure criterion of the disease.

Keywords: Leishmaniasis. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Flow Cytometry. Immunoglobulin G; Isotypes. Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Formas evolutivas da <i>Leishmania</i> spp	18
Figura 2 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	19
Figura 3 Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	20
Figura 4 Lesões de paciente de LTA.....	23
Figura 5 Respostas imunes celular e humoral em infecções por parasitas.....	28
Figura 6 Histogramas da porcentagem de parasitas fluorescentes positivos.....	38
Figura 7 Reatividade de anticorpos IgG - Imunofluorescência Indireta	43
Figura 8 Reatividade de IgG - Ensaio Imunoenzimático	45
Figura 9 Curvas de titulação de anticorpos IgG - Citometria de Fluxo.....	46
Figura 10 Avaliação da aplicabilidade da citometria de fluxo - IgG	47
Figura 11 Comparação de curvas ROC - Citometria x IFI.....	48
Figura 12 Curvas de sensibilidade e especificidade - Citometria.....	49
Figura 13 Comparação entre as curvas ROC - Elisa x Citometria de Fluxo	50
Figura 14 Avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG1	51
Figura 15 Curvas de titulação na diluição 1:400 do isotipo IgG1	52
Figura 16 Avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG1 na identificação de pacientes	52
Figura 17 Curva ROC para o isotipo IgG1	53
Figura 18 Avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG2	54
Figura 19 Curvas de titulação na diluição 1:100 do isotipo IgG2.....	56
Figura 20 Avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG3	57
Figura 21 Curvas de titulação na diluição 1:200 do isotipo IgG3.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Categorias para os resultados dos testes de diagnóstico dos pacientes.....	39
Tabela 2 Características clínico-epidemiológicas dos pacientes.....	40
Tabela 3 Resultados laboratoriais dos pacientes suspeitos de LTA.....	41
Tabela 4 Resultados do teste de imunofluorescência dos pacientes antes e após tratamento.....	42
Tabela 5 Resultados do teste de ELISA dos pacientes antes e após tratamento.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(V.)	<i>Viannia</i>
ASC	Área sob a curva
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	17
3.2 Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana	19
3.3 Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	21
3.4 Critério de cura da Leishmaniose Tegumentar Americana	22
3.5 Perspectivas de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana	24
3.6 Resposta imune na Leishmaniose Tegumentar Americana.....	25
3.7 Diagnóstico Clínico da Leishmaniose Tegumentar Americana	29
3.8 Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Tegumentar Americana	29
4 METODOLOGIA	34
4.1 Tipo de estudo	34
4.2 População de estudo	34
4.2.1 Considerações éticas.....	34
4.2.2. Coleta de amostras.....	35
4.3 Triagem dos pacientes.....	35
4.4 Obtenção das formas promastigotas fixadas de <i>L. V. braziliensis</i>	35
4.5 Obtenção de soro.....	35
4.6 Reação de imunofluorescência indireta.....	36
4.7 Reação de ELISA	36
4.8 Citometria de fluxo para análise das subclasses IgG.....	37
4.8.1 Análise dos dados.....	38
4.9 Análise estatística.....	38
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Caracterização da população de estudo e resultados laboratoriais.....	40
5.2 Imunofluorescência indireta	41
5.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	43
5.4 Avaliação de IgG total por citometria de fluxo.....	45
5.5. Análise das curvas ROC entre IFI e Citometria de Fluxo	47
5.6. Análise das curvas ROC entre ELISA e Citometria de Fluxo.....	49

5.7. Padronização dos isotipos de IgG	50
5.7.1. Padronização do isotipo IgG1	50
5.7.2 Padronização do Isotipo IgG2	54
5.7.3. Padronização do isotipo IgG3	56
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES	62
8 PERSPECTIVAS	63
 REFERÊNCIAS	 64
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTES)	76
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (15-18 ANOS)	77
APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (GRUPO CONTROLE)	78
APÊNDICE D - ARTIGO SUBMETIDO	79
APÊNDICE E - CAPÍTULO DE LIVRO.....	94
APÊNDICE F – PARECER COMITÊ DE ÉTICA	96

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença negligenciada cuja transmissão é dada por vetores do gênero *Lutzomyia*. Cerca de 1,5 milhões de casos são reportados por ano, compreendendo as duas principais formas clínicas: a forma cutânea localizada (CL) e a forma mucocutânea (MC) (POURMOHAMMADI *et al.*, 2010; ELMAHALLAWY *et al.*, 2014). No Brasil, as regiões Norte e Nordeste são as mais afetadas, e em Pernambuco, incide em todas as regiões, predominantemente na Zona da Mata com mais de 60% dos casos, onde quase a totalidade é da forma cutânea localizada (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994; BRITO *et al.*, 2009; NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

Atualmente, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 20 espécies de *Leishmania* que causam a doença já foram descritas (OMS, 2013). A forma localizada é causada pelas seguintes espécies: *Leishmania aethiopica* (*L. aethiopica*), *L. major* e *L. tropica* no velho mundo; e *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana* no novo mundo; para MC, as espécies que causam a doença são: *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (ALVES, 2004). No Brasil a espécie predominante é a *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (*L. [V.] braziliensis*). (CROFT; COOMBS, 2003; TIUMAN *et al.*, 2011).

Em relação aos métodos de diagnóstico utilizados atualmente para a LTA, uma das grandes dificuldades enfrentadas pelos pesquisadores tem sido a escolha da preparação antigênica ideal para análise sorológica, tanto no que se refere ao estudo dos mecanismos moduladores e/ou indutores de doença, bem como para o diagnóstico, prognóstico e monitoração da infecção (BRITO *et al.*, 2000; BRITO *et al.*, 2001; GONÇALVES *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2002; CELESTE *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2006; KEDZIERSKI, 2011; MUTISO *et al.*, 2013).

Devido a essas limitações, sobretudo das técnicas de Imunofluorescência Indireta e ELISA, abordagens imunológicas alternativas vêm sendo desenvolvidas. Uma delas é a citometria de fluxo, tecnologia que promove a análise quantitativa de anticorpos e que vem sendo utilizada no diagnóstico sorológico da LTA (ROCHA *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013). Em paralelo, alguns estudos

avaliam a diminuição dos níveis de anticorpos em pacientes após o tratamento e a possibilidade de utilizar testes sorológicos, como a citometria de fluxo, não apenas para o diagnóstico, mas como critério de cura da LTA (AMATO, 1998; BRITO *et al.*, 2001; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Embora estudos avaliem a resposta humoral da doença, ainda não está completamente esclarecido o papel de anticorpos específicos na imunidade contra *Leishmania*. A análise deste tipo de resposta na LTA tem abordado o papel das imunoglobulinas em mecanismos imunopatológicos envolvidos na resistência e/ou patogênese da infecção; além disso, também avaliam o uso em investigações sorológicas no diagnóstico e no monitoramento da eficácia pós-tratamento (RODRIGUEZ; CENTENO; ULRICH, 1996; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Nas leishmanioses cutânea e mucocutânea, a imunidade celular e a predominância de isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 têm sido associadas a resposta do tipo Th1; já o perfil Th2 tem sido relacionado a leishmaniose cutânea difusa com presença de IgG4 (RODRIGUEZ *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 2005), direcionando a atenção para a correlação das subclasses de IgG com as manifestações clínicas da LTA. A intensidade da resposta humoral está relacionada com a carga parasitária e a cronicidade da infecção, e podem ser observados altos títulos de anticorpos em todas as manifestações clínicas da LTA (TRUJILLO *et al.*, 2000; REIS, 2007).

A LTA possui um amplo espectro de formas clínicas, que dependem das características do vetor, do parasita e também da genética do hospedeiro (MARZOCHI, 1992; GRIMALDI; TESH, 1993). Uma das maiores problemáticas das infecções por *Leishmania* é a habilidade desses parasitas em evadir e subverter as respostas imunes do hospedeiro; essa característica permite que os parasitas persistam e estabeleçam infecções crônicas nos pacientes (GURUNG; KANNEGANTI, 2015). A resposta imune inata é imprescindível para a eliminação rápida de patógenos invasores, e de maneira geral, se aceita que as células T e a imunidade mediada por células correspondam ao mecanismo protetor contra a LTA (TRUJILLO *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2005).

O presente estudo teve como objetivo o uso de isotipos de imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) por citometria de fluxo para o diagnóstico e critério de cura na LTA.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a aplicabilidade dos isotipos de imunoglobulinas por citometria de fluxo para o diagnóstico e critério de cura na leishmaniose tegumentar americana.

2.2 Específicos

- Caracterizar a população de estudo quanto aos aspectos clínicos e laboratoriais;

- Identificar os pacientes com doença ativa e após cura clínica por tratamento quimioeterápico com ênfase na pesquisa de isotipos IgG (IgG1, IgG2 e IgG3) anti-promastigotas fixadas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*;

- Padronizar e avaliar a aplicabilidade da pesquisa de isotipos IgG (IgG1, IgG2, IgG3);

- Comparar as técnicas de reação de imunofluorescência indireta, ELISA e citometria de fluxo na identificação de pacientes antes e após cura clínica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana

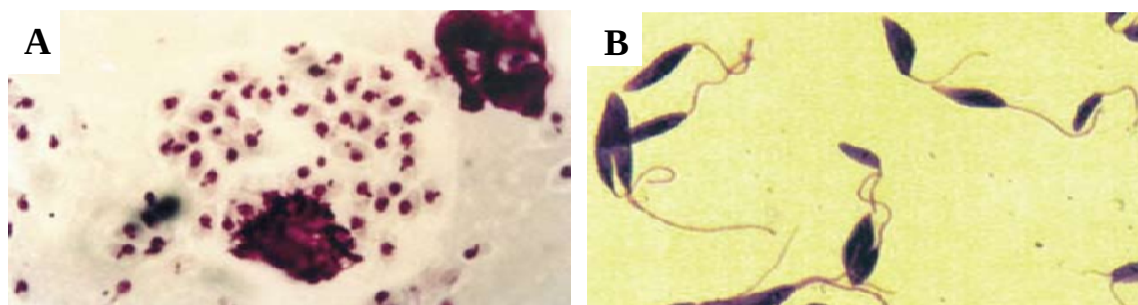
A LTA é uma das dermatoses tropicais com mais casos no mundo e tem uma grande importância na saúde pública. A doença é causada por várias espécies do protozoário *Leishmania*, sendo o responsável pelas diferentes manifestações clínicas apresentadas. A LTA é endêmica em mais de 98 países em toda a África, Ásia, sul da Europa e América Latina. Novos focos da doença estão surgindo devido a mudanças ecológicas no habitat do vetor, desmatamentos e urbanização (DESJEUX, 2004; AMEEN, 2010; OMS, 2010; ALVAR *et al.*, 2012).

No Brasil, a LTA está distribuída em todos os Estados e se encontra também na periferia das grandes cidades do Nordeste e do Centro-Oeste. Com um elevado número de casos, a LTA também é caracterizada por apresentar uma importante difusão espacial, exibindo assim, uma heterogeneidade que está relacionada às diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas em sua etiologia; às formas clínicas associadas e ao padrão de transmissão envolvido. Em Pernambuco a doença está presente em todas as regiões, sendo mais predominante na Zona da Mata. (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994; LAINSON; SHAW, 2005; NEGRÃO; FERREIRA, 2014). De acordo com dados obtidos do Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN), em Pernambuco, nos períodos de 2006 a 2009, a doença afetou 5 em cada 100.000 pessoas.

Existem seis principais espécies de *Leishmania* envolvidas na etiologia da LTA no Brasil, porém, apenas a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pertence ao subgênero *Leishmania*, as outras cinco espécies estão representadas no subgênero *Viannia*: *Leishmania (Viannia) guyanensis* (*L. [V.] guyanensis*), *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) braziliensis* (BRASIL, 2007). As distribuições da infecção e da doença na população foram bem caracterizadas na Zona da Mata de Pernambuco em inquéritos epidemiológicos que foram realizados no período entre 1991 e 1996. Amostras isoladas de pacientes desta região apresentaram perfis isoenzimáticos de variantes para a principal espécie circulante *L. (V.) braziliensis* (BRITO *et al.*, 1993; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010).

A *Leishmania* apresenta-se nas formas amastigota (A) e promastigota (B) (Figura 1), sendo a primeira forma intracelular, presente nas células do sistema monocítico-fagocitário do hospedeiro vertebrado, e a segunda, forma infectante presente no tubo digestivo do vetor e em meios de cultura. (VEGA-LÓPEZ, 2003; BASANO, 2004; OMS, 2010).

Figura 1 - Formas evolutivas da *Leishmania* spp.



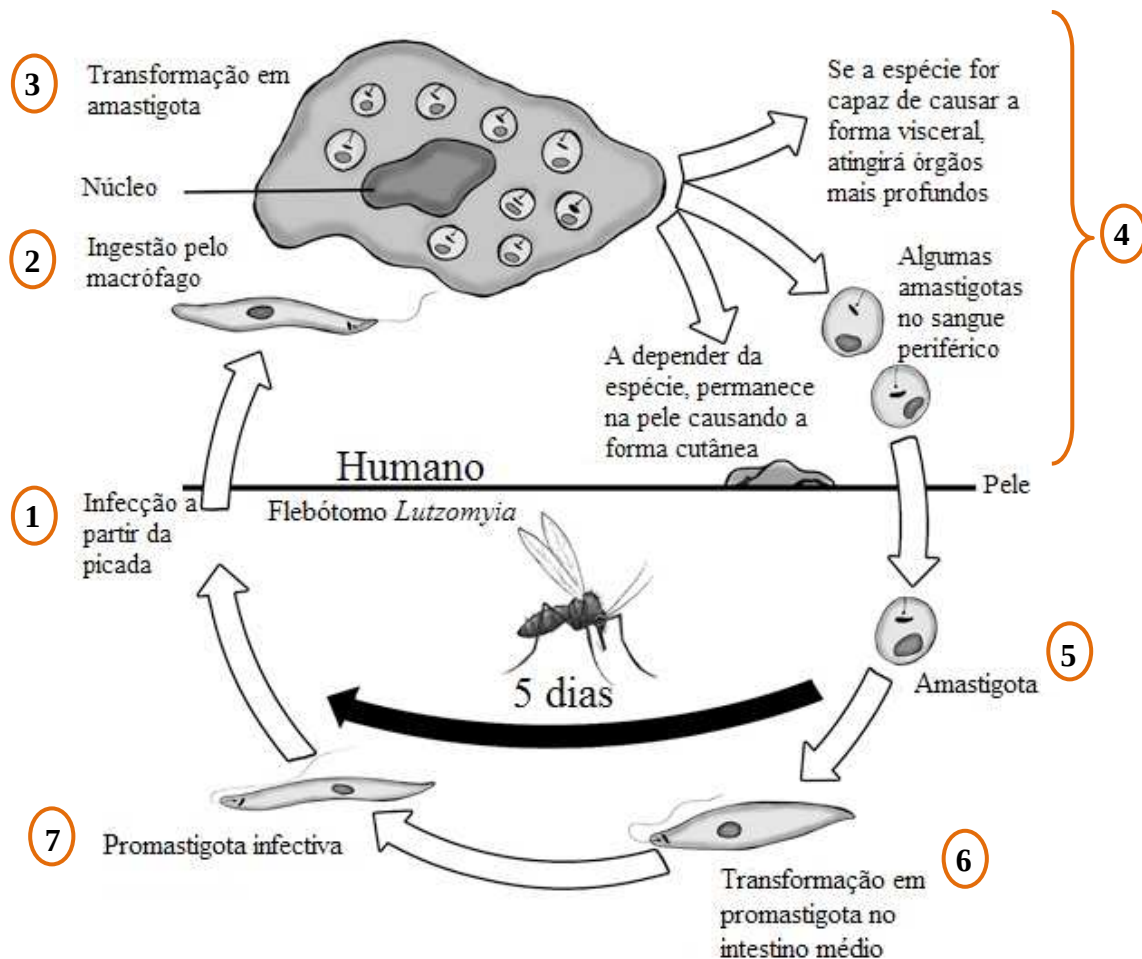
Fonte: BRASIL, 2007. Caracterização das formas evolutivas de *L. (V.) braziliensis*, em que (A) apresenta a forma amastigota do parasito no interior de macrófagos e (B) sua forma promastigota em meio extracelular.

O ciclo evolutivo da *Leishmania* se inicia através do repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, quando a fêmea ingere formas amastigotas do parasita que estão presentes na circulação sanguínea; essas formas são encontradas no interior de macrófagos, monócitos e histiócitos, alojadas nos fagossomos dessas células, onde se reproduzem assexuadamente por divisão binária até eventualmente romperem as células; dessa forma, se disseminam pelas vias hematogênica e linfática do hospedeiro (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BASANO, 2004).

No trato digestivo do flebótomo, os as células ingeridas contendo as formas amastigotas se rompem liberando o parasita, que posteriormente se aloja em partes do intestino, transformando-se então na forma promastigota. Durante o repasto sanguíneo ocorre a transmissão do parasita, quando as formas promastigotas são inoculadas através da picada no hospedeiro vertebrado, incluindo o homem e outros mamíferos. Entre quatro e oito horas, as promastigotas são interiorizadas pelas células fagocíticas do hospedeiro, se diferenciando novamente em formas amastigotas, que se multiplicam e podem ser novamente ingeridas pelo vetor, completando o ciclo, (Figura 2) (NEVES, 2002).

Com relação às características moleculares, o parasita apresenta DNA extranuclear (kDNA) incluso no cinetoplasto, organela mitocondrial incomum típica da ordem Kinetoplastida. Essa organela apresenta minicírculos e maxicírculos, que são alvos de biologia molecular utilizados para o diagnóstico.

Figura 2 - Ciclo biológico da *Leishmania* spp.



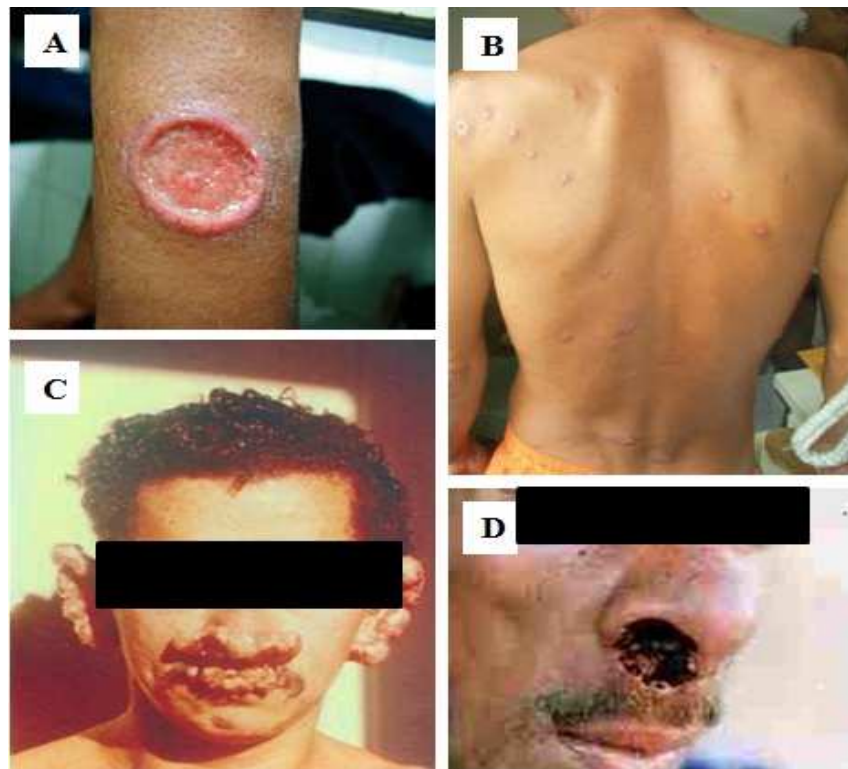
Fonte: Adaptado de <http://rowdy.msudenver.edu/~churchcy/BIO3270/Images/Protozoans/Leishmania.jpg>

3.2 Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação para qualquer das espécies de *Leishmania* causadoras da doença. A lesão primária é geralmente única, porém, múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação local podem aumentar o número de lesões (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O tempo de desenvolvimento da lesão a partir do momento da picada do vetor pode variar de semanas até meses. Inicialmente pode haver a formação de um pequeno eritema não específico, que depois irá se desenvolver para a lesão

papular. Também pode haver a formação de nódulos, que podem evoluir para ulcerações (Figura 3) (AMEEN, 2010).

Figura 3 - Formas clínicas da Leishmaniose tegumentar americana.



Fonte: Adaptado de GONTIJO; CARVALHO, 2003. A) Forma localizada; B) Forma disseminada; C) Forma difusa; D) Forma mucocutânea.

A forma cutânea localizada (A) é a manifestação mais frequente da doença. As lesões são únicas ou em pequeno número. A forma típica possui bordas elevadas, é indolor e assume formas arredondadas ou ovais (REITHINGER *et al.*, 2007; GOTO; LINDOSO, 2010; OLIANI, 2012). A densidade de parasitas nas bordas da lesão é maior nas fases iniciais da doença, no entanto, diminuem nas lesões crônicas. Em caso de infecção bacteriana no local, podem ocorrer dor e produção de exsudato seropurulento. A *L. (V.) braziliensis* produz úlceras únicas ou múltiplas, com disseminação por via hematogênica como a principal complicação, evoluindo para a leishmaniose mucocutânea (BRASIL, 2007; GOTO; LINDOSO, 2010; OLIANI, 2012).

Com numerosas lesões de vários formatos e tamanhos, a forma disseminada (B) varia de dezenas a centenas em partes do corpo, contínuas ou não. Essa forma difere

da forma anérgica, a cutânea difusa (C), onde lesões nodulares não ulceradas são encontradas por todo o corpo. É considerada uma forma rara da doença e sua agressividade pode levar o indivíduo a óbito (BRASIL, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007; GOTO; LINDOSO, 2010; OLIANI, 2012).

Conhecida também como úlcera de Bauru, a forma mucocutânea (D) ocorre como resultado do desenvolvimento secundário da forma cutânea localizada. É caracterizada pela destruição da cavidade oronasal, faringe e laringe, resultado da reação imunológica exacerbada. A doença também pode surgir da cura espontânea sem tratamento ou que recebeu tratamento inadequado, desenvolvendo lesões secundárias destrutivas em mucosas e cartilagens. A leishmaniose mucocutânea pode também atingir as conjuntivas oculares, e as mucosas dos órgãos genitais e ânus (NEVES, 2002; BRASIL, 2007; AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010; OLIANI, 2012).

3.3 Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana

Para todas as formas clínicas da LTA, o tratamento de primeira escolha é feito através de antimoniais pentavalentes como o antimoniato de meglumine/antimoniato de N-metilglucamine (Glucantime®) ou estibogluconato de sódio (Pentostam®, não comercializado no Brasil). Os antimoniais são drogas consideradas “leishmanicidas” por interferirem na bioenergética das formas amastigotas, inibindo tanto a glicólise como a oxidação de ácidos graxos e vêm sendo utilizados no tratamento da doença desde meados de 1929 (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007; KEDZIERSKI, 2011).

O esquema terapêutico é composto por doses de 15 a 20 mg/Kg/dia através de injeções intramusculares ou endovenosa em ciclos de vinte a trinta dias (OMS, 2010). Já foi descrito que na dose de 20mg Sb+5/kg/dia, o antimonial pode atingir seu limiar de toxicidade, levando a alterações cardíacas, pancreáticas ou renais que obriguem a suspensão do tratamento. O índice de sucesso após um primeiro ciclo de antimoniato de N-metilglucamina é de 16% (GOTO; LINDOSO, 2010). O longo tempo de duração do tratamento e a aplicação intravenosa ou intramuscular ocasionam diminuição no número de pacientes que aderem ao tratamento. Além disso, apesar dos antimoniais serem as principais drogas contra a *Leishmania*, usadas há mais de 50 anos, ainda não se sabe corretamente o mecanismo de ação destas drogas (REIS, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007; GOTO; LINDOSO, 2010; OMS, 2010).

O tratamento de segunda escolha é realizado nas formas não responsivas ao tratamento convencional ou na sua impossibilidade, através da utilização de drogas como Anfotericina B e Pentamidina (FUNASA, 2000; GONTIJO; CARVALHO, 2003; BASANO, 2004; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Algumas drogas utilizadas para LTA no velho mundo, como antibióticos tópicos apresentam eficácias variadas e risco de evolução para forma mucocutânea. Dada a termossensibilidade das formas promastigotas, o tratamento com frio/calor vem sendo empregado a partir de técnicas com lâmpadas infravermelhas ou com luz ultravioleta, e/ou crioterapia com CO₂ ou nitrogênio líquido (CROFT *et al.*, 2006; AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010; BRELAZ-DE-CASTRO, 2012; OLIANI, 2012). Esses estudos, porém, ainda precisam de maiores investigações para assegurar a eficácia desses novos candidatos à terapêutica da LTA (CROFT; COOMBS, 2003; CROFT *et al.*, 2006; KEDZIERSKI, 2010; KEDZIERSKI, 2011; BRELAZ-DE-CASTRO, 2012).

Antígenos recombinantes de *Leishmania* também têm sido testados como candidatos à imunoterapia. A associação de antimoniais com imunomoduladores poderá ser uma alternativa de tratamento para pacientes refratários aos antimoniais. Embora esta modalidade de tratamento seja crescente, ensaios clínicos precisam ser realizados para demonstrar o seu benefício na rotina clínica (CROFT; COOMBS, 2003; AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010).

Existem ainda casos que se curam espontaneamente, algumas vezes com uma evolução clínica inferior a três meses de infecção, sugerindo que esses pacientes desenvolvem uma resposta imune capaz de controlar a sua infecção por *Leishmania* (BRITO *et al.*, 2001; AMEEN, 2010; TIUMAN *et al.*, 2011; GURUNG; KANNEGANTI, 2015).

3.4 Critério de cura da Leishmaniose Tegumentar Americana

O critério de cura até o momento é clínico, quando há completa cicatrização da lesão (Figura 4), sendo o paciente acompanhado por, pelo menos, um ano após o término do tratamento (FUNASA, 2000; GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007). Todavia, mesmo com o tratamento adequado, a ocorrência de recidivas e/ou

comprometimento de mucosas pode acontecer, ocorrendo em 2% dos casos tratados e em aproximadamente 10% dos casos não tratados (CUNNINGHAM, 2002).

Figura 4 - Lesões de paciente de LTA.



Fonte: leishmaniose.weebly.com. Acessado em 22/01/2015. A) Paciente com lesão ativa; B) Paciente após tratamento.

Algumas abordagens como a utilização de testes parasitológicos (cultivo e isolamento da *Leishmania*) já haviam sido sugeridas como critério de cura após o tratamento da LTA. Contudo, supondo que a resposta imune humoral possa desempenhar um papel modulador da resposta celular durante a infecção, na década de 60, (BITTENCOURT, 1968) sugeriu a possibilidade da pesquisa de anticorpos no monitoramento de cura da LTA. Os autores observaram o estudo da reatividade de anticorpos anti-*Leishmania* através da sorologia convencional pela imunofluorescência indireta (IFI), que foi sugerida como critério de cura pós-terapêutica na LTA.

Na possibilidade de utilizar a IFI como critério de cura, estudos mostraram a diminuição dos níveis de anticorpos em pacientes após o tratamento com antimoniais, sugerindo a existência de correlação entre cura clínica das lesões e a negatificação dos títulos da IFI (AMATO, 1998; SCHUBACH *et al.*, 1998). Outros autores têm chamado a atenção para a possibilidade de utilização do teste de ELISA, para avaliação do valor preditivo da persistência de anticorpos IgG no desenvolvimento da LTA (CELESTE *et al.*, 2004; MENDONÇA *et al.*, 2004; ROMERO *et al.*, 2005). A demonstração da persistência de parasitos após a cura clínica levanta vários assuntos direcionados para a evolução clínica, epidemiológica e para o controle da LTA (MENDONÇA *et al.*, 2004). Ainda assim, o uso desses testes como critério de cura é um assunto controverso, uma

vez que ocorre a demonstração da persistência de positividade nos ensaios após cura, seja ela espontânea ou pós-terapêutica (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 2002; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2014). A OMS ainda sugere que testes sorológicos sejam utilizados para auxiliar no critério de cura clínico, muito embora esses testes não estejam difundidos na prática devido a sua baixa eficácia na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (OMS, 1990).

3.5 Perspectivas de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana

Existem diferentes abordagens utilizadas no controle da LTA. Dentre elas, ressalta-se a vigilância epidemiológica (notificação de casos e tratamento); tratamento dos pacientes para evitar a infecção com novos vetores impedindo o fechamento do ciclo e medidas educativas como o uso de repelentes, mosquiteiros e também, evitar a poluição do ambiente. Outras abordagens incluem medidas administrativas como saneamento. Melhoria das condições de habitação e capacitação de profissionais de saúde também são essenciais (BASANO, 2004; DESJEUX, 2004; OMS, 2010; NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

A vacinação continua sendo a melhor alternativa para o controle das Leishmanioses. O desenvolvimento de uma vacina eficiente, segura e rentável é uma prioridade global e crítica para a saúde pública. Por mais de um século, pesquisadores tentam desenvolver uma vacina com essas características, porém, devido às limitações de conhecimento sobre a patogênese do parasita e a falta de um antígeno ideal, ainda não se obteve êxito (KEDZIERSKI, 2010; KEDZIERSKI; EVANS, 2014).

Vacinas de primeira geração (com parasitas vivos atenuados) foram desenvolvidas em diversos países, mas não passaram nos testes clínicos, sobretudo por apresentarem uma eficácia muito limitada. Além das vacinas de primeira geração, abordagens utilizando antígenos recombinantes têm sido testadas em modelos animais (MAZUMDER *et al.*, 2011; SÁNCHEZ-SAMPEDRO *et al.*, 2012).

Uma grande evidência em estudos com modelos animais indica que a proteção ideal pode ser dada através da imunização com subunidades definidas ou de cepas vivas e atenuadas de *Leishmania*. No entanto, atualmente nenhuma vacina está disponível no mercado, mesmo com o esforço de vários pesquisadores de laboratórios diferentes. Os maiores impedimentos são: baixo financiamento dado por agências nacionais e

internacionais; dificuldade de associar os dados obtidos de experimentos em murinos com a doença em humano e a transição laboratório-campo (MUTISO *et al.*, 2013). Por isso, ainda existem muitos desafios para que a vacinação para as Leishmanioses se torne uma realidade.

3.6 Resposta imune na Leishmaniose Tegumentar Americana

A maior parte dos conhecimentos de imunologia na LTA, sobretudo em relação à interação parasito-hospedeiro, são provenientes dos estudos de infecções em modelos animais (REIS *et al.*, 2007; BRELAZ-DE-CASTRO, 2012). Isso se deve à grande dificuldade de crescimento *in vitro* deste parasita, uma vez que sua transformação na forma infectante é ineficiente em condições padronizadas de cultura, onde ocorre a resistência natural de muitas linhagens de camundongos frente à infecção, sendo necessária uma grande carga parasitária para que ela ocorra (LIMA; DEKREY; TITUS, 1999; DE MOURA *et al.*, 2005). Portanto, a dificuldade em estabelecer modelos animais adequados para se estudar a *L. (V.) braziliensis* contribuiu para o surgimento de estudos com pacientes (REIS *et al.*, 2009).

Tanto nas infecções animal e humana por *Leishmania* sp, assim como em todas as formas clínicas da doença, a imunidade é predominantemente mediada por linfócitos T, e de maneira geral, se aceita que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção esteja associada ao nível de expansão de células Th1 e Th2 (BACELLAR, 2002; SOUZA *et al.*, 2005; REIS, 2007). Linfócitos T CD4⁺ que apresentam o perfil Th1 têm sua diferenciação estimulada pelas citocinas IL-12 e interferon-gama (IFN- γ) e expressam o fator de transcrição T-beta. Células que apresentam o perfil Th2 são estimuladas por IL-4 e expressam o fator de transcrição GATA-3 (SAKAGUCHI, 2003; REIS *et al.*, 2009). Além disso, IL-10 juntamente a TGF- β e ácido retinóico atuam na ativação do perfil Th3, com diferenciação de células regulatórias (SAKAGUCHI, 2003; BELKAID, 2007; ALMEIDA, 2011).

As células Th1 estão envolvidas no processo de eliminação de patógenos intracelulares, bem como nas respostas imunológicas do tipo celular. Por outro lado, os linfócitos do tipo Th2 estão envolvidos na indução da resposta humoral e em quadros de eosinofilia. As células do tipo Th1 são caracterizadas pela secreção de IL-2, IFN- γ e do TNF. Já as células do tipo Th2 produzem IL4, IL5, IL6, IL9, IL10 e IL13. As subpopulações Th1 e Th2 também induzem a síntese de anticorpos de isotipos

diferentes. A estimulação policlonal de células B *in vitro* e a indução de respostas de anticorpos específicos a um antígeno, *in vitro* ou *in vivo*, demonstram que as células Th1 induzem respostas de anticorpos dominadas pelo isotipo IgG2a, enquanto as células Th2 favorecem a síntese de isotipos IgG1, IgE e IgA (COFFMAN; CARTY, 1986; SCOTT *et al.*, 1988; PINHEIRO; AMERICANA, 2004).

Sabe-se que ocorre influência do padrão de citocinas na ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B em células produtoras de imunoglobulinas (TRUJILLO *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2005; THOMAS; BUXBAUM, 2008; DE ASSIS SOUZA *et al.*, 2013). Também é descrito que citocinas do tipo um, produtoras de IFN- γ , induzem a produção de IgG1 (OZBILGE *et al.*, 2006). Quando associado a IL-6, o IFN- γ induz a produção de IgG2 e antagoniza a produção de IgG1 (KAWANO; NOMA; YATA, 1994). Citocinas do tipo dois, produtoras de IL-4 e IL-5 induzem a produção de altos níveis de IgG3, IgG4, IgE e IgA em humanos (GASCAN *et al.*, 1991; KITANI; STROBER, 1993; ULRICH *et al.*, 1995). Trabalhos mostram que a produção de IgG3, IgG4 e IgE está associada a IL-4, e sua inibição está associada ao IFN- γ ; enquanto isso, o aumento dos níveis de IgG1 e IgG3 estão associados ao IL-10 (SKEIKY *et al.*, 1997; THOMAS; BUXBAUM, 2008). No entanto, os níveis de IgA dependem de TGF- β (STAVNEZER; KANG, 2009).

O papel dos linfócitos B na LTA causada por espécies do subgênero (*Viannia*) ainda não está muito bem esclarecido. Estudos em pacientes colombianos infectados com essas espécies revelaram uma infiltração proeminente de linfócitos B nas lesões e no local onde foi feita a Intradermoreação de Montenegro (IDRM) (PALMA; SARAIVA, 1997; GUARÍN *et al.*, 2006). Outro estudo, realizado no Brasil, mostrou um aumento significativo na frequência de linfócitos B em aspirados de linfonodos de pacientes que apresentavam linfadenopatias decorrentes ao estágio avançado do desenvolvimento da lesão (BOMFIM *et al.*, 2007). Esses achados sugerem que essas células desempenham importante papel na resposta imune contra *Leishmania* spp. Em modelos animais, os linfócitos B contribuíram na regulação da resposta imunológica através da produção de citocinas e imunoglobulinas (ROSSI-BERGMANN; MÜLLER; GODINHO, 1993; WANASEN; XIN; SOONG, 2008). Porém, isso pode variar dependendo da espécie, da cepa utilizada e da genética do animal (WANASEN *et al.*, 2008; RNET *et al.*, 2010).

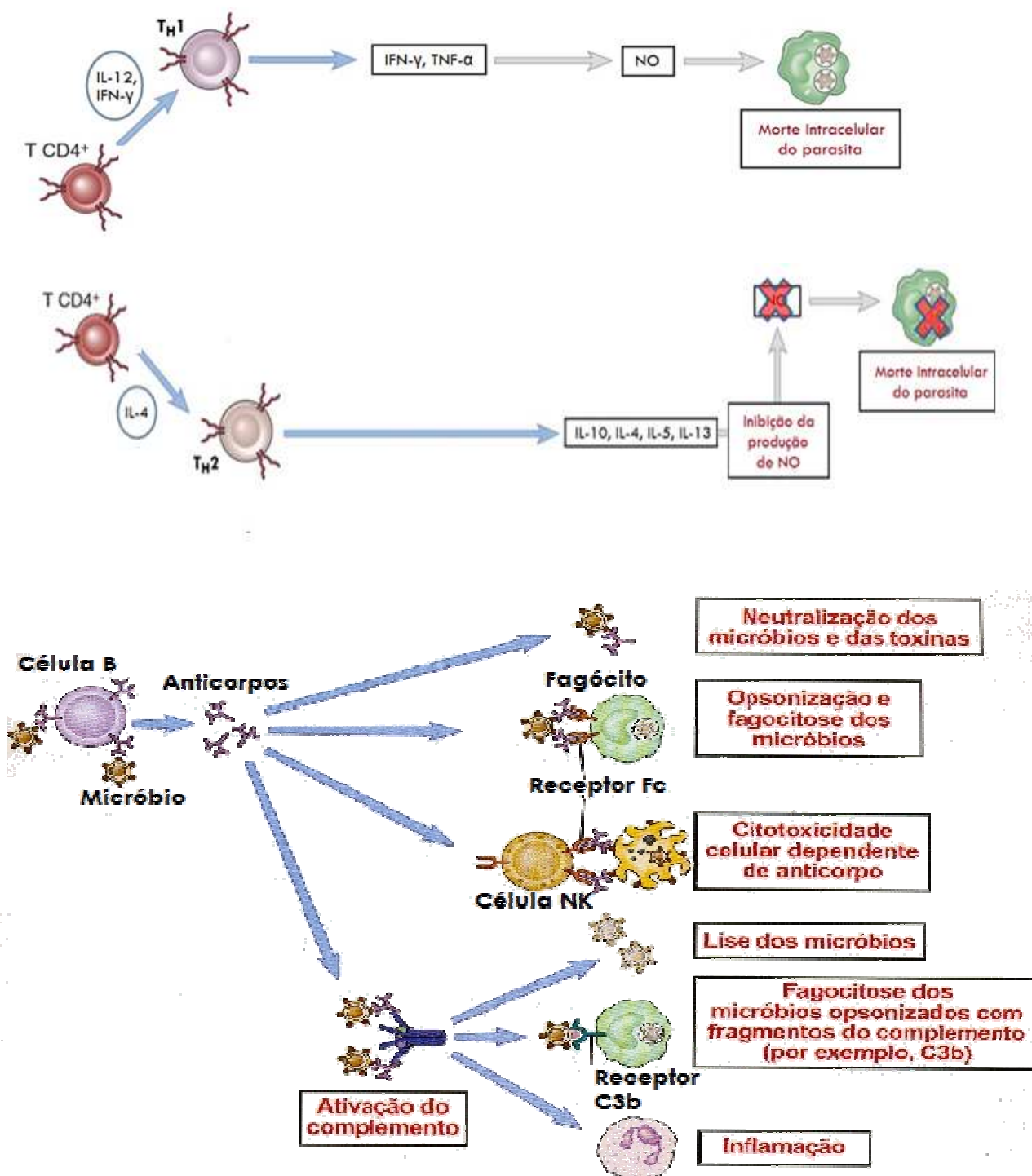
A contribuição dos linfócitos B na LTA em humanos ainda não foi muito explorada. As células B são competentes células apresentadoras de antígeno (APCs) capazes de ativar células T *naive*. A capacidade dessas células de produzirem citocinas que estimulam tanto a resposta Th1 quanto a resposta Th2 já foi documentada (LUND, 2008), assim como o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias na infecção por espécies de *Leishmania* do subgênero (*Viannia*), como IFN- γ , TNF, IL-13 e IL-6 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes, mostrando que os linfócitos B podem ser utilizados como alvos para modular a resposta imune na LTA, como estratégia terapêutica (RODRIGUEZ-PINTO; SARAIVA; MCMAHON-PRATT, 2014).

Estudos têm se concentrado na análise da resposta imune humoral na LTA (TRUJILLO *et al.*, 2000; PEDRAS *et al.*, 2003; OZBILGE *et al.*, 2006; FAGUNDES-SILVA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015). É geralmente aceito que a resposta imune protetora na infecção por *Leishmania* seja essencialmente celular, relegando a participação dos anticorpos a segundo plano (KEDZIERSKI; EVANS, 2014; GURUNG; KANNEGANTI, 2015). A associação entre o perfil da resposta imune humoral e a patogênese de um dado processo infeccioso, no contexto do padrão de classes de anticorpos, foi realizada em várias doenças humanas, tais como hanseníase (HUSSAIN; KIFAYET; CHIANG, 1995), AIDS (OUAAZ *et al.*, 1996), filariose (KURNIAWAN *et al.*, 1993) e malária (PERLMANN *et al.*, 1997). Entretanto, a contribuição da resposta imune humoral na LTA em mecanismos imunopatológicos da doença é menos estudada (O'NEIL; LABRADA; SARAIVA, 1993; RODRIGUEZ *et al.*, 1996; ROCHA *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2007; PINHEIRO, 2013).

Direcionando a atenção para a correlação das subclasses de IgG com as manifestações clínicas da LTA, foi demonstrado que todos os isotipos específicos anti-*Leishmania*, exceto IgD, são detectados no soro de pacientes com LTA. A frequência de detecção das subclasses de IgG na LTA, de acordo com Souza *et al.*, (2005) e Pissinate *et al.*, (2008), é $IgG1 > IgG3 > IgG2 = IgG4$. Os pacientes com um maior tempo de evolução da doença apresentam altos níveis de IgE e nos pacientes com a forma mucocutânea, os níveis de IgA estão aumentados (O'NEIL *et al.*, 1993; SOUZA *et al.*, 2005). A intensidade da resposta humoral está relacionada com a carga parasitária e a

cronicidade da infecção, e podem ser observados altos títulos de anticorpos em todas as manifestações clínicas da LTA (TRUJILLO *et al.*, 2000; REIS *et al.*, 2007).

Figura 5 - Respostas imunes celular e humoral em infecções por parasitas.



Fonte: Adaptado de (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

3.7 Diagnóstico Clínico da Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA apresenta dificuldades no seu diagnóstico devido aos aspectos das lesões se assemelharem aos de outras doenças como tuberculose cutânea, hanseníase virchowiana, infecções micóticas, úlcera tropical, sífilis, neoplasmas, e até mesmo alguns tipos de carcinomas e linfomas (NEVES, 2002; GONTIJO; CARVALHO, 2003; PISSINATE *et al.*, 2008; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015).

As lesões cutâneas da LTA podem se apresentar morfológicamente como: impetigóide, liquenóide, tuberculosa/lupóide, nodular, vegetante e ectimatóide, o que dificulta ainda mais o diagnóstico clínico. Nas lesões mucocutâneas, podem ser observadas úlceras infiltrantes ou úlceras vegetantes (ANDRADE, 2005).

Devido a essa grande diversidade de manifestações clínicas, o diagnóstico da LTA deve ser realizado através da associação de aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (NEVES, 2002; GONTIJO; CARVALHO, 2003). O diagnóstico clínico pode ser feito com base na característica da lesão que o paciente apresenta, associada à anamnese, assim como a avaliação dos dados epidemiológicos da doença. O diagnóstico clínico-epidemiológico pode ser complementado pela Intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva e eventualmente pela resposta terapêutica. Todavia, os métodos laboratoriais são fundamentais para o diagnóstico diferencial de outras doenças (NEVES, 2002; BRASIL, 2007).

3.8 Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Tegumentar Americana

As diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas, as formas clínicas e o tempo de evolução das lesões podem se apresentar em diferentes manifestações e direcionam o diagnóstico para os métodos laboratoriais (REIS *et al.*, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007; FAGUNDES-SILVA *et al.*, 2012). Os exames laboratoriais podem ser capazes de pesquisar diretamente o parasita ou seu material genético, assim como os anticorpos do paciente. O diagnóstico conclusivo é feito pela visualização do parasita, através da pesquisa direta, isolamento em cultura ou inoculação em animais experimentais (MACHADO, 2004; BRASIL, 2007). A pesquisa direta do parasito pode ser realizada em material obtido da lesão por escarificação, aspiração ou biópsia da borda da lesão. A visualização em microscópio óptico da forma amastigota de *Leishmania* sp é possível

após coloração pelo método de Giemsa ou Leishman (GENARO; NEVES, 1998). Essa técnica tem sensibilidade que varia entre 50 e 70% e depende do número de parasitos presentes na lâmina (GOTO; LINDOSO, 2010). A positividade do teste é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após um ano. Embora seja uma técnica simples, rápida e de baixo custo, não é capaz de detectar parasitas em todos os pacientes (VEGA-LÓPEZ, 2003; BENSOUSSAN, 2006).

O isolamento do parasita pode ser feito através da cultura em meios apropriados, a partir de material obtido por punção aspirativa ou biópsia das lesões dos pacientes. A sensibilidade do isolamento em cultura é geralmente baixa, em torno de 20 a 40%. Essa baixa sensibilidade está relacionada em muitos casos à escassez do parasita nas lesões, principalmente quando se trata da *L. (V.) braziliensis* (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; BENSOUSSAN, 2006; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2006; REITHINGER et al., 2007). A inoculação em animais susceptíveis para cultivo *in vivo*, utiliza principalmente o hamster (*Mesocricetus auratus*). Devido ao longo período de acompanhamento até a formação da úlcera no animal e aos elevados custos para manutenção dos animais, o método se restringe às instituições de pesquisa científica (RODRIGUES, 2000; BENSOUSSAN, 2006; BRASIL, 2007).

A reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) é uma técnica que permite a amplificação de segmentos específicos de DNA a partir de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) pareados especificamente nas margens da região alvo, permitindo o seu uso como instrumento específico para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas (SINGH, 1997; GOMES et al., 1999; RODRIGUES, 2000; RODRIGUES et al., 2002). Embora várias abordagens moleculares tenham sido desenvolvidas para o diagnóstico da Leishmaniose e a PCR convencional seja uma técnica altamente sensível e específica, se trata de um teste prático para uso na rotina laboratorial, com exigências técnicas e custo ainda elevado, embora esteja sendo cada vez mais encontrado em laboratórios de referência (REITHINGER et al., 2007; DE ASSIS SOUZA et al., 2013).

O diagnóstico imunológico baseia-se na avaliação da resposta imune celular utilizando a técnica de Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e/ou na avaliação da resposta imune humoral utilizando as técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*- ELISA) e western blot.

Atualmente, já existem trabalhos utilizando a citometria de fluxo como um método alternativo e auxiliar para o diagnóstico, possuindo vantagens sobre os métodos convencionais utilizados (ROCHA *et al.*, 2002; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015).

A detecção da imunidade celular através da IDRM tem sido empregada como um importante recurso no diagnóstico imunológico da LTA, dada sua grande sensibilidade e especificidade, chegando a valores próximos de 80%. Também pode ser utilizada como importante ferramenta para inquéritos epidemiológicos. O teste consiste na injeção de uma suspensão de antígeno preparado com promastigotas para a indução de resposta de hipersensibilidade tardia, onde a reação é lida após 48 a 72 horas (MACHADO, 2004; GOTO; LINDOSO, 2010). Embora apresente resultado positivo na maioria dos casos de LTA (90%), o resultado é negativo em lesões recentes, na forma cutânea difusa e em pacientes imunodeprimidos. Em áreas endêmicas, é comum o teste ser positivo devido à ocorrência de infecções subclínicas (VEGA-LÓPEZ, 2003; REIS *et al.*, 2007). Além disso, o teste não diferencia doença ativa de pregressa (WEIGLE *et al.*, 2002; REITHINGER *et al.*, 2007).

A avaliação da resposta imune humoral na LTA tem sido geralmente abordada através de testes sorológicos, e os mais utilizados atualmente são a IFI, o ELISA e o Western blot (KAR, 1995; TRUJILLO *et al.*, 2000; JANI *et al.*, 2002; BRASIL, 2007; POURMOHAMMADI *et al.*, 2010; ELMAHALLAWY *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2014). Estes testes apresentam controvérsias no diagnóstico da LTA, principalmente considerando sua baixa sensibilidade, especificidade e pouca reprodutibilidade. Além disso, podem apresentar reações cruzadas com outros tripanosomatídeos. Sabe-se ainda que não há uma correlação entre níveis de anticorpos circulantes com a presença de infecção ativa (PASSOS *et al.*, 2000; SCHALLIG; OSKAM, 2002; SAVANI *et al.*, 2003; ALVES, 2004).

A IFI é uma técnica amplamente utilizada no diagnóstico da LTA. Podem ser observadas, frequentemente, reações cruzadas com outros organismos da família Trypanosomatidae, gerando resultados falso-positivos com soros de pacientes portadores de doença de Chagas e leishmaniose visceral (VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996; BRITO *et al.*, 2009). Há também, relatos de reatividade cruzada com soro de pacientes portadores de hanseníase e tuberculose (KAR, 1995). Além

disso, ocorre grande variabilidade nos resultados de técnicas sorológicas que dependem da natureza do antígeno; que pode estar associado aos diferentes antígenos utilizados e principalmente pela forma como foram produzidos e purificados (TAVARES; FERNANDES; MELO, 2003). A técnica de ELISA consiste em uma metodologia de realização simples, bastante utilizada nas investigações científicas. Embora apresente maior sensibilidade em relação à IFI, tem sido menos utilizada na rotina laboratorial por apresentar custo mais elevado e exigências laboratoriais superiores à IFI (MACHADO, 2004; ROMERO *et al.*, 2005). O Western blot tem sido mais utilizado no diagnóstico da leishmaniose visceral (KAR, 1995). Em estudo comparativo, Brito *et al.*, (1999) demonstrou que a técnica de Western blot apresentou maior sensibilidade e especificidade em relação às técnicas de IFI e ELISA.

Atualmente, essas técnicas sorológicas aumentaram sua sensibilidade e especificidade em testes diagnósticos para as Leishmanioses, especialmente a LTA (PEDRAS *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2005; PISSINATE *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que a quantificação das subclasses de IgG por ELISA ou citometria de fluxo levou a um aumento na acurácia dos testes para o diagnóstico da LTA. A quantificação de IgG1 e IgG3 parece ser uma boa metodologia para o acompanhamento de pacientes de LTA tratados (SOUZA *et al.*, 2005; FAGUNDES-SILVA *et al.*, 2012; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015).

Tendo em vista as dificuldades inerentes das técnicas sorológicas utilizadas na rotina laboratorial para o diagnóstico da LTA, novas propostas metodológicas vêm sendo desenvolvidas. A citometria de fluxo é um recurso que permite análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão (FALDYNA *et al.*, 2001; NAKAGE *et al.*, 2005). As células da amostra em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos, que permitem a identificação e a quantificação de células pelo seu tamanho, sua granulosidade e intensidade de fluorescência. Esta técnica apresenta várias vantagens para os imunoensaios, tais como possibilidade de quantificação do analito, volume reduzido de amostra, elevada reprodutibilidade e sensibilidade, uma ampla faixa dinâmica, e, sobretudo potencial para multiplexagem (JANI *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2013; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015).

Esta tecnologia também já é utilizada para o diagnóstico de vários tipos de câncer, como a leucemia. Os serviços são terceirizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), que firmam uma parceria entre laboratórios particulares e hospitais públicos. Se validada a técnica para o diagnóstico da LTA, existe a possibilidade de também terceirizar serviços para esta finalidade. Porém, para isso, é necessária qualificação de recursos humanos e investimento de capital para aquisição do equipamento e reagentes para os laboratórios que realizariam o serviço.

Considerando as aplicabilidades da citometria de fluxo descritas por Martins-Filho et al., (1995), e sabendo que a utilização dos isotipos pode contribuir com uma maior acurácia nos testes (PISSINATE *et al.*, 2008), é válido salientar que a aplicação da citometria de fluxo, na detecção da LTA em pacientes antes e após tratamento pode contribuir para a obtenção de um método de maior sensibilidade e especificidade, com aplicação diagnóstica e como critério de cura na doença.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

O estudo é do tipo experimental ou ensaio clínico não randomizado. Este ensaio consiste na comparação entre um grupo de participantes sujeitos à intervenção e outro formado por sujeitos não-expostos à intervenção, denominado controle. Ambos escolhidos a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003).

4.2 População de estudo

Os pacientes do presente estudo foram procedentes de área endêmica para LTA em Pernambuco. Foram selecionados 14 pacientes, onde 12 possuíam a forma cutânea localizada, um a forma disseminada e um a forma mucocutânea. Foram pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 15 anos, portadores de lesões ativas, sem doenças cutâneas concomitantes. Só fizeram parte do estudo os que tiveram diagnóstico positivo para LTA em pelo menos dois testes laboratoriais entre: pesquisa direta, IDRM, isolamento e PCR. Os pacientes estavam cientes do objetivo do estudo. Eles foram acompanhados para realização de procedimentos para coleta de 10 ml de sangue antes do tratamento e após tratamento quimioterápico com Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina), sob orientação médica.

4.2.1 Considerações éticas

Prosseguimos com os procedimentos para coleta de sangue somente após o paciente ter concordado em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) (apêndices A e B). O grupo controle (n=10) foi constituído por indivíduos saudáveis, residentes em área não endêmica, somente após assinarem o TCLE (apêndice C). Foram coletados 10 mL de sangue do grupo de controle, constituído por voluntários do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. O material coletado foi processado na mesma Instituição, na cidade de Recife-PE. Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ, parecer nº 043/2007.

4.2.2. Coleta de amostras

Todos os pacientes envolvidos no estudo foram atendidos por uma profissional Médica Dermatologista do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), nos postos de saúde dos municípios visitados (busca ativa) onde realizaram a anamnese e a coleta de sangue. As amostras foram repassadas para o Serviço de Referência em Leishmanioses do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da FIOCRUZ Pernambuco. Por se tratar de um projeto maior, as coletas iniciaram há cerca de 10 anos. Foram utilizadas amostras de pacientes antes do tratamento, um ano, dois e cinco anos após o tratamento.

4.3 Triagem dos pacientes

Para inclusão no presente projeto, os pacientes foram submetidos a alguns procedimentos laboratoriais para confirmação da doença no Serviço de Referência em Leishmanioses.

4.4 Obtenção das formas promastigotas fixadas de *L. V. braziliensis*

Inicialmente formas promastigotas da cepa de referência (MHOM/BR/75/M2903) mantidas *in vitro* foram expandidas em meio Schneider's até atingirem fase exponencial. Em seguida, os parasitas foram transferidos para tubos de polipropileno de 50mL, e foram submetidos a baixa centrifugação (100 X g), 25°C por 10 minutos. Em seguida, os parasitas foram recuperados do sobrenadante, após 10 minutos em repouso a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 50mL e o sedimento desprezado. Os parasitas foram lavados em salina tamponada contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), por três vezes, a 4°C, 871 X g durante 10 minutos. O sedimento formado foi homogeneizado e ressuspensão em solução fixadora de Paraformaldeído a 1% e estocado por 24h a 4°C. Após incubação, os parasitas foram lavados com salina tamponada contendo 3% de SFB, por duas vezes. Em seguida a concentração foi ajustada para o ensaio de citometria de fluxo.

4.5 Obtenção de soro

A partir do sangue dos pacientes que foi recebido do Serviço de Referência em Leishmanioses, o soro foi obtido após centrifugação a 400 X g por 5 minutos a temperatura ambiente. As amostras de soro foram inativadas a 56°C por 30 minutos e

centrifugadas a 4°C, 1000 X g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aliquoteado e estocado a -20°C até sua utilização.

4.6 Reação de imunofluorescência indireta

O teste de IFI foi realizado de acordo com o protocolo *in house* desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do CPqAM. A suspensão antigênica de promastigotas, utilizada neste ensaio, foi aplicada um volume de 10 µL desta suspensão em região delimitada de lâminas de IFI, fixando-se durante 2 horas a 37 °C. Em seguida, foram recobertas com 10 µL das amostras dos soros diluídos na razão 1:40 em PBS 0,01 M, pH 7,2. Foram adicionados dois soros padrões (positivo e negativo) na diluição de 1:40, e incubados em câmara úmida por 30 minutos à 37 °C. Após incubação, foi retirado o excesso de soro das lâminas, lavando-as por imersão em PBS, pH 7,2 por três vezes em intervalos de 5 minutos. Uma diluição na razão de 1:100 de anti-IgG humana (específica para cadeia pesada) conjugada ao isotiocianato de fluoresceína-FITC (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) preparada em azul de Evans 1 % na solução tampão de PBS, (previamente diluído na razão 1:10 no mesmo tampão), foi colocada sobre as lâminas, incubando-se nas mesmas condições anteriores. Após a reação, as lâminas foram lavadas três vezes por 5 minutos em PBS e deixadas à temperatura ambiente. A montagem foi feita com glicerina tamponada pH 8,7 e, em seguida, as lâminas foram observadas no microscópio de fluorescência por três observadores, com a objetiva de 40x.

4.7 Reação de ELISA

O ensaio de ELISA foi realizado com o protocolo desenvolvido *in house* no Laboratório de Imunogenética do CPqAM. A placa foi sensibilizada com 100 µL por poço do antígeno a 5 µg/mL, previamente diluído em tampão Carbonato/Bicarbonato 0.06 M pH 9.6. A placa foi incubada a 4°C/ 18 horas em câmara úmida. Após incubação, foi lavada 3 vezes com PBS 0.015 M pH 7.2 contendo 0.05% de tween 20, onde na primeira lavagem desprezou-se o sobrenadante e nas outras duas deixou-se em repouso por 10 minutos antes de desprezar. Os soros foram diluídos de 1/40 até 1/1280 em PBS 0.015 M pH 7.2 contendo 0.05% de tween 20 e leite em pó. Em cada placa foi adicionado um padrão negativo com as mesmas diluições das amostras, para que fossem calculados posteriormente os valores da média e desvio padrão. Foram adicionados 100

μL por poço do soro diluído e a placa foi incubada por 1 h em câmara úmida a 37°C. Novamente foi feita lavagem, da mesma forma citada acima. Foi feita incubação por 1h com 100 μL por poço do conjugado peroxidase anti- IgG humana cadeia gama específica, no título ideal para o teste (Calbioquem/ título de 1/2500). A placa foi lavada mais 3 vezes com PBS 0.015 M pH 7.2 contendo 0.05% de tween 20, como já descrito. O volume de 100 μL por poço do cromógeno (ácido 5-amino salicílico ou OPD) foi adicionado. Após 1h de incubação em câmara úmida à temperatura ambiente e na ausência da luz, a reação foi parada com 25μL por poço de NaOH 1M e então realizada leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 450nm. Para interpretação dos resultados, o limiar de reatividade de cada soro positivo foi calculado levando-se em consideração a média aritmética das absorbâncias das diluições do controle negativo mais 2 vezes o desvio padrão. Assim, são consideradas amostras positivas as que tiverem títulos maiores que o resultado da relação descrita acima.

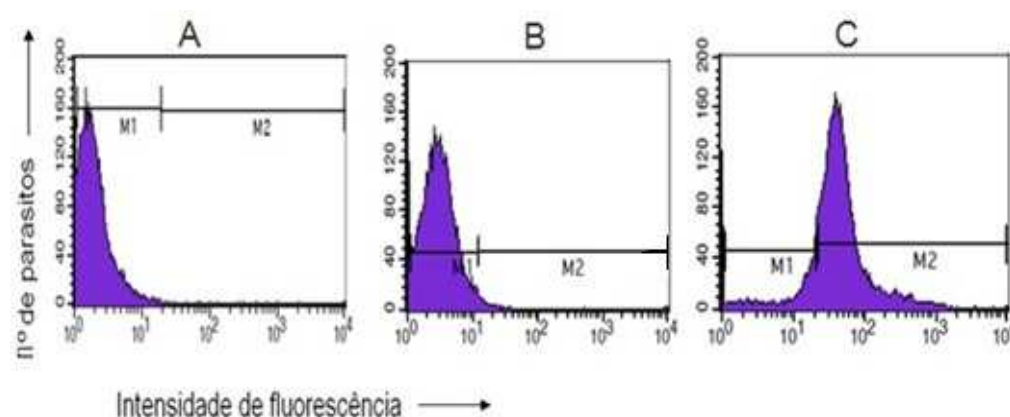
4.8 Citometria de fluxo para análise das subclasses IgG

O ensaio de citometria de fluxo para a pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi realizado de acordo com Rocha *et al.* (2002) no equipamento FACS Calibur (Becton & Dickson) com aquisição de 20.000 eventos. Uma suspensão de parasitas (5×10^6 /poço) foi incubada em placas de 96 poços, fundo em “U” a 37°C por 30 minutos na presença de diferentes diluições do soro (1:64 a 1:8192). Após incubação com soros, os parasitas foram lavados duas vezes com 150 μl de PBS-10% SFB (800 X g por 10 minutos, a 4°C). Para análise das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), foi realizada a incubação dos parasitos a 37°C por 30 minutos, na presença de 50μL de anticorpos anti-subclasses de IgG humano marcados com biotina (Sigma ChemicalCorp., St. Louis, MO) diluídos em PBS-10% SBF seguida por 2 lavagens com PBS-10% SBF. Em seguida, os parasitas foram reincubados a 37°C por 30 minutos, na presença de 10μL de estreptoavidina conjugada a ficoeritrina-SAPE (Gibco), diluída 1:100 em PBS-10% de SFB. Após a incubação com os anticorpos reveladores, os parasitas foram lavados e fixados com 200μL de solução fixadora. As amostras foram mantidas por 30 minutos, a 4°C, ao abrigo de luz, até o momento da leitura no citômetro de fluxo. As leituras das amostras no citômetro de fluxo foram realizadas num período máximo de 24 horas após a fixação dos parasitas.

4.8.1 Análise dos dados

Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitas após incubação com soros obtidos dos pacientes e soros controles são expressos sob a forma de percentual de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) observados para cada teste individual em relação ao controle do conjugado. O PPFP é determinado para cada amostra através do estabelecimento de um limiar de negatividade em função da curva de fluorescência obtida para o controle da ligação inespecífica do conjugado. Para cada experimento é estabelecido um limiar de reatividade de no máximo 2% de PPFP para o controle interno da reação (controle do conjugado). Em seguida, empregando-se o mesmo marcador são obtidos os valores de PPFP para amostras individuais. A Figura 6 mostra o histograma de PPFP sobre o qual os dados são analisados.

Figura 6: Histogramas da porcentagem de parasitas fluorescentes positivos.



Fonte: Histograma realizado pela autora no programa CellQuestPro®. A: Controle interno da reação; B: Controle negativo; C: Amostra de paciente positivo. M1 corresponde à região negativa e M2 à região positiva no histograma.

4.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada para avaliação do desempenho dos testes diagnósticos em estudo, para definição do ponto de corte através da construção da *Receiver Operating Characteristic*– curva ROC, avaliação dos índices de desempenho e intervalo de confiança. Os testes foram realizados utilizando o programa estatístico MedCalc Statistical. Todas as conclusões foram tomadas no nível de significância de 95%.

Os índices de desempenho da IFI e da citometria de fluxo também podem ser avaliados a partir da classificação dos resultados em quatro categorias, de acordo com a presença de lesão (grupo antes do tratamento - AT) ou ausência de lesão (grupo pós-tratamento - PT). Estas categorias estão expressas na tabela 1 e foram definidas da seguinte forma: Verdadeiro-Positivo (VP) = presença de lesão e teste positivo; Falso-Positivo (FP) = ausência de lesão e teste positivo; Falso-Negativo (FN) = presença de lesão e teste negativo e Verdadeiro-Negativo (VN) = ausência de lesão e teste negativo (Tabela 1).

Tabela 1 - Categorias para os resultados dos testes de diagnóstico dos pacientes.

		LTA	
		AT	PT
Resultado do teste	Positivo	VP (a)	FP (b)
	Negativo	FN (c)	VN (d)
Total		(a+c)	(b+d)

Fonte: A autora.

Com base nestes fundamentos, podem ser calculados os índices sensibilidade e especificidade. A sensibilidade é calculada pela relação $a/(a+c)$ traduzindo a proporção de pacientes portadores LTA (positivos), nos quais os testes IFI, ELISA ou citometria de fluxo foram positivos. Já, a especificidade diz respeito à proporção de indivíduos sem manifestação clínica de LTA (negativos) sendo determinada pela relação $d/(b+d)$.

Na maioria casos, o resultado foi apresentado juntamente com seu intervalo de confiança (IC 95%) de forma que fornecesse a precisão do valor estimado, este que está relacionado com a amplitude do intervalo, onde intervalos mais estreitos correspondem a estimativas mais precisas.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população de estudo e resultados laboratoriais

De acordo com os parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, todos os pacientes foram diagnosticados como portadores de LTA (Tabela 2). Todos os pacientes apresentaram lesões cutâneas e foram submetidos ao tratamento com Glucantime®.

Tabela 2 - Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo.

Paciente	Sexo	Idade	Localidade	Forma Clínica	Nº de lesões	Local das lesões	Tamanho das lesões (cm ²)	Evolução das lesões(meses)	Nº de ampolas
1	M	17	Moreno	CL	03	2 Região lombar E Axila	9; 21;0,5	1	49
2	F	46	Moreno	CL	03	Perna E;PernaD;Região lombar	18;5;8,75	1	20
3	M	34	Moreno	CL	01	Braço E	8,75	2	20
4	F	NI	Moreno	CL	01	Braço E	6	1	20
5	F	15	Amaraji	CD	>20	-	-	NI	20
6	M	46	Moreno	CL	01	Braço E	7,5	1	30
7	M	75	Moreno	CL	01	Braço D	6,25	2	30
8	M	20	Moreno	CL	02	Perna E;Perna D	7,5; 10,5	3	20
9	M	28	Aldeia	CL	01	Tórax	2	2	30
10	M	51	Moreno	MC	01	Lóbulo D	4,5;	1	95
11	M	30	Aldeia	CL	01	Perna E	25	1	50
12	F	24	Vitória de Santo Antônio	CL	01	Tornozelo D	3	2	20
13	M	33	Moreno	CL	01	Perna D	20,25	36	30
14	F	15	Moreno	CL	03	Glúteo;Coxa;Perna D	22,5; 10; 10	12	30

Fonte: Elaborado pela autora. F= feminino, M=masculino, NI= não informado, CL= cutânea localizada, CD= cutânea disseminada, MC= mucocutânea, D= direta, E= esquerda.

Os testes laboratoriais para a confirmação do diagnóstico dos pacientes foram realizados em colaboração com o Serviço de Referência em Leishmanioses do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Os testes incluíram a Intradermoreação de Montenegro (IDRM), pesquisa direta, PCR e isolamento em animal (Tabela 3). Pacientes que apresentaram pelo menos dois testes laboratoriais positivos foram incluídos no estudo.

Tabela 3 - Resultados laboratoriais dos pacientes suspeitos de LTA, atendidos pelo serviço de referência em leishmanioses do CPqAM/FIOCRUZ.

Paciente	IDRM (mm)	Pesquisa direta	PCR	Isolamento
1	5	NR	+	N
2	10	+	+	S
3	15	+	+	N
4	15	+	+	N
5	NR	-	+	S
6	10	-	+	S
7	5	+	+	N
8	10	-	+	N
9	10	+	-	S
10	5	-	+	S
11	15	-	+	N
12	-	+	+	S
13	15	NR	+	S
14	6	-	NR	S
Positivos:	85,7%	50%	92,3%	57,14%

Fonte: Elaborado pela autora. IDRM = Intradermoreação de Montenegro; PCR = Reação em cadeia de polimerase; + = positivo; - = negativo; NR= não realizado; S = sim; N = não.

5.2 Imunofluorescência indireta

Os pacientes, que demonstraram títulos a partir de 1:20, foram considerados positivos neste teste. Dos soros avaliados, 92,85% (13/14) foram positivos antes do tratamento. Um ano após o tratamento com Glucantime®, 61,54% (8/13) foram

positivos; dois anos após o tratamento 70% (7/10) foram positivos e cinco anos após o tratamento 50% (5/10) dos soros avaliados ainda continuaram positivos para o teste de imunofluorescência indireta (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados do teste de imunofluorescência indireta dos pacientes antes e após o tratamento com Glucantime® expressos em inverso do título de diluição.

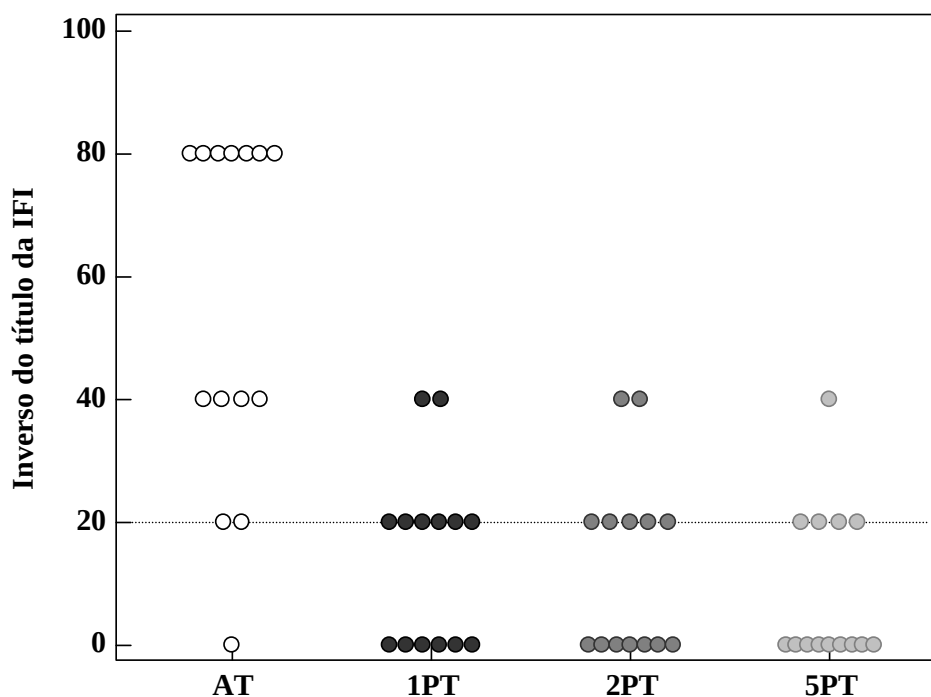
Paciente	AT	1PT	2PT	5PT
1	-	20	20	20
2	80	40	40	-
3	80	20	20	20
4	20	-	-	40
5	80	40	40	NR
6	40	-	NR	-
7	80	-	-	-
8	80	20	NR	NR
9	80	20	20	20
10	80	-	-	-
11	40	-	NR	20
12	20	20	20	NR
13	40	NR	NR	NR
14	40	20	20	-

Positivos: 92,85% 61,54% 70% 50%

Fonte: Elaborado pela autora. IFI= imunofluorescência indireta; AT= antes do tratamento; PT= pós-tratamento; NR= não-realizado.

Para avaliar a aplicabilidade deste método em identificar LTA ativa, foi realizado um gráfico a partir do programa estatístico MedCalc, utilizando os valores do inverso do título da diluição em que os pacientes foram positivos para o teste. Dessa forma, foi possível realizar a avaliação da reatividade de IgG total dos soros dos pacientes antes e após o tratamento, como demonstrado na Figura 7.

Figura 7 - Reatividade de IgG em soros de pacientes antes e 1, 2 e 5 anos após tratamento, submetidos ao método de imunofluorescência indireta. A linha pontilhada corresponde ao ponto de corte de 1:20.



Fonte: Realizado pela autora através do software MedCalc Statistical.

5.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Nas placas, foram feitas diluições seriadas do soro dos pacientes, compreendendo cinco diluições: de 1:40 a 1:1280. Os pacientes que apresentaram títulos de soro a partir da diluição 1:40 foram considerados positivos para o teste. Dos soros avaliados, 92,8% (13/14) dos pacientes antes do tratamento com Glucantime® foram positivos; 53,8% (7/13) dos pacientes após um ano de tratamento foram positivos; 88,8% (8/9) dos pacientes dois anos após tratamento foram positivos e 100% dos pacientes cinco anos após tratamento (5/5) continuaram com título positivo para LTA (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados do teste de ELISA dos pacientes antes e após tratamento com Glucantime® expressos em inverso do título da diluição.

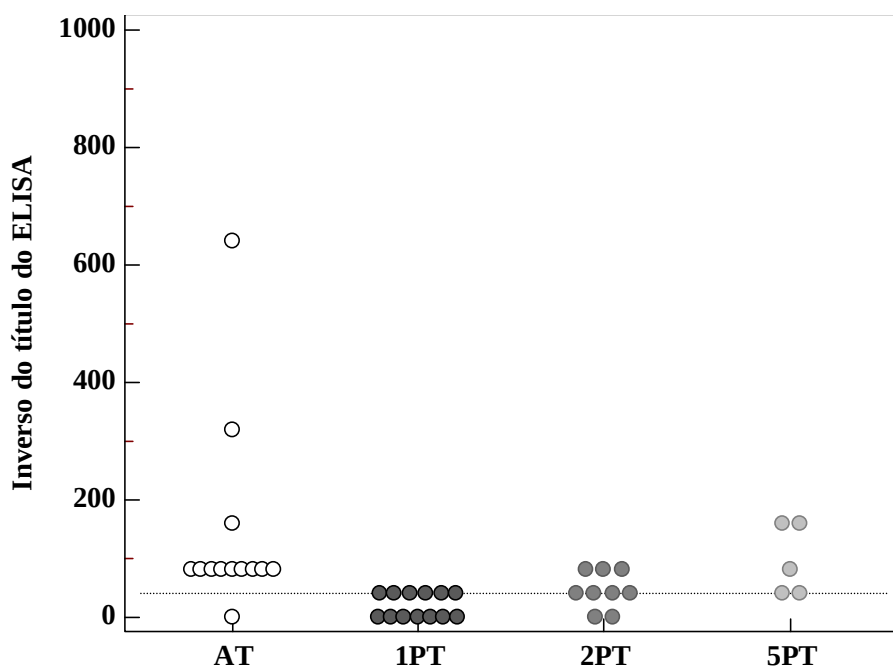
Paciente	AT	1PT	2PT	5PT
1	80	40	-	NR
2	80	-	NR	NR
3	320	-	40	160
4	80	NR	80	NR
5	160	40	40	40
6	160	-	NR	NR
7	80	-	NR	NR
8	80	-	80	160
9	80	-	80	NR
10	160	-	80	NR
11	640	40	NR	80
12	80	40	40	40
13	-	40	NR	NR
14	80	40	40	NR

Positivos: 92,85% 46,15% 88,8% 100%

Fonte: Elaborado pela autora. ELISA = ensaio imunoenzimático; AT = antes do tratamento; PT = pós-tratamento; NR = não-realizado; - = negativo.

Para avaliar a aplicabilidade do ELISA em identificar LTA ativa, foi realizado um gráfico a partir do programa MedCalc Statistical, utilizando os valores do inverso do título da diluição em que os pacientes foram considerados positivos para o teste. Dessa forma, foi possível realizar a avaliação da reatividade de IgG total dos soros dos pacientes antes e após o tratamento, como pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 - Reatividade de IgG em soros de pacientes antes e 1, 2 e 5 anos após tratamento, submetidos ao método de ELISA. A linha pontilhada corresponde ao ponto de corte de 1:40.



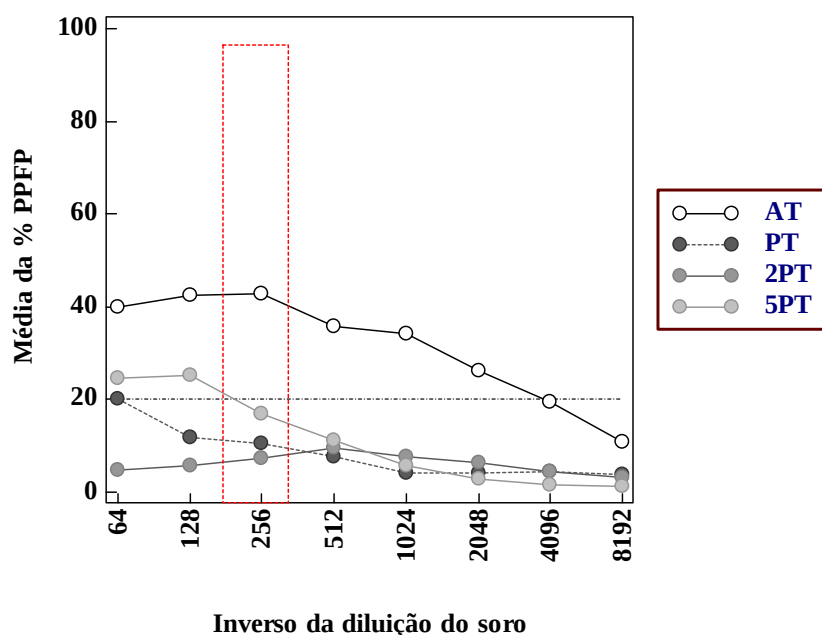
Fonte: Realizado pela autora através do software MedCalcStatistical.

5.4 Avaliação de IgG total por citometria de fluxo

Para realizar a comparação entre os testes de IFI e ELISA com a citometria de fluxo para o diagnóstico da LTA, foram realizados experimentos com o anticorpo IgG anti-formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em pacientes portadores de LTA antes e um, dois e cinco anos após o tratamento.

A reatividade do ensaio de citometria de fluxo, foi expressa a partir da média dos valores de PFP dos soros, obtida após incubação dos soros nas diluições de 1:64 a 1:8192, com promastigotas fixadas nas condições previamente padronizadas. Empregou-se o ponto de corte de 20% de PFP, como proposto por Martins-Filho (1995). A análise da curva de titulação de anticorpos IgG anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes, expressos como médias dos valores de PFP, sugerem que a diluição 1:256 é a região (R) de reatividade que corresponde ao primeiro título de reação diferencial entre os indivíduos antes do tratamento (AT) e um, dois e cinco anos após tratamento (PT) (Figura 9).

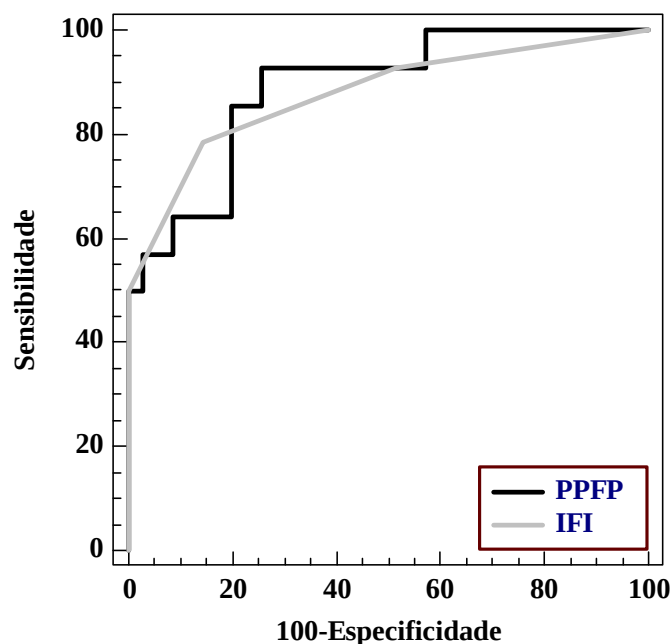
Figura 9 - Curvas de titulação de anticorpos IgG anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes nos soros dos pacientes.



Fonte: Realizado pela autora através do software MedCalc Statistical. Os pacientes foram classificados quanto a presença de lesão (AT) e a ausência de lesão (1, 2 e 5 anos PT). A linha tracejada corresponde ao ponto de corte de 20% de PPFP.

A região de reatividade 1:256 para as amostras individuais dos soros AT e PT, foram analisadas adicionalmente com o objetivo de avaliar sua aplicabilidade na identificação de pacientes em atividade clínica para LTA (Figura 10). Empregando-se o ponto de corte de 20% de PPFP, foi demonstrado que a pesquisa é aplicável a identificação de casos de leishmaniose cutânea localizada uma vez que permitiu identificar 86% (12/14) dos indivíduos AT com valores situados numa região de alta reatividade, ou seja, positivos; e 77% (10/13), 80% (8/10) e 70% (7/10) dos indivíduos, respectivamente, um, dois e cinco anos PT com valores de PPFP restritos a uma região de baixa reatividade, ou seja, negativos para o ensaio de citometria de fluxo.

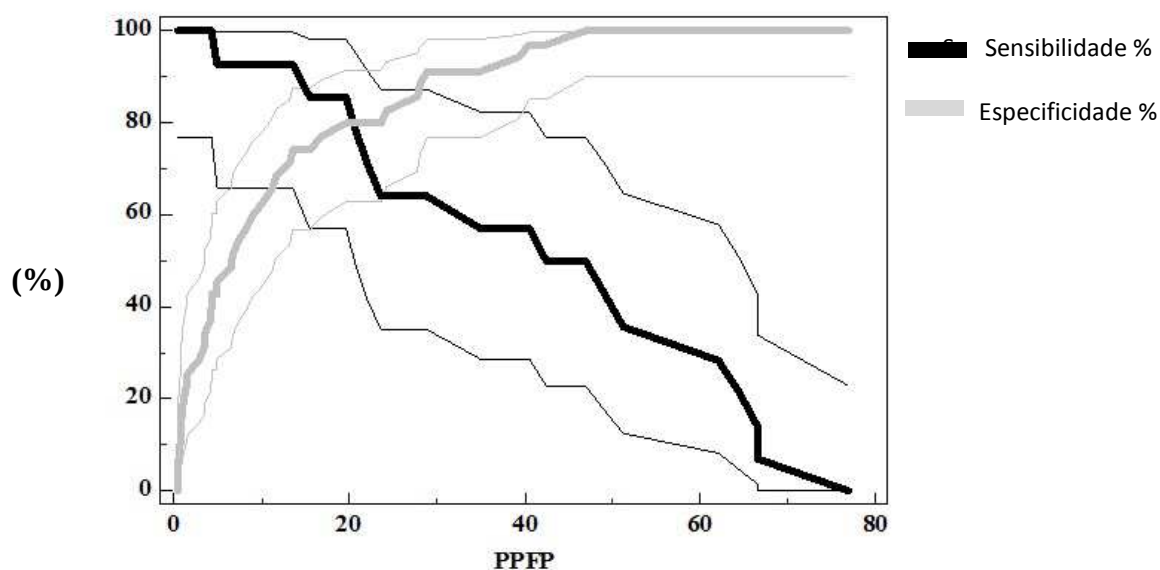
Figura 11 - Comparação entre as curvas ROC de IFI e citometria de fluxo.



Fonte: Realizado pela autora a partir do programa MedCalc Statistical. Curvas construídas a partir do desempenho, sensibilidade e 100- especificidade dos testes avaliados. 0,9 e 0,8 correspondem às ASC (área sob a curva) da citometria de fluxo e IFI, respectivamente.

Além disso, foi realizada a construção da curva ROC para confirmar o ponto de corte de 20% para o ensaio de citometria de fluxo. Foram construídas curvas de sensibilidade e especificidade em diferentes pontos de corte. O ponto onde as curvas se encontram, corresponde ao ponto de corte ideal. A figura 12 apresenta os valores de sensibilidade e especificidade em função dos diferentes pontos de corte, onde um ponto de corte em 20% de PPFP é o melhor para demonstrar o desempenho do teste.

Figura 12 - Curvas de sensibilidade e especificidade da citometria de fluxo obtidas a partir de diferentes pontos de corte expressos em PPFP.

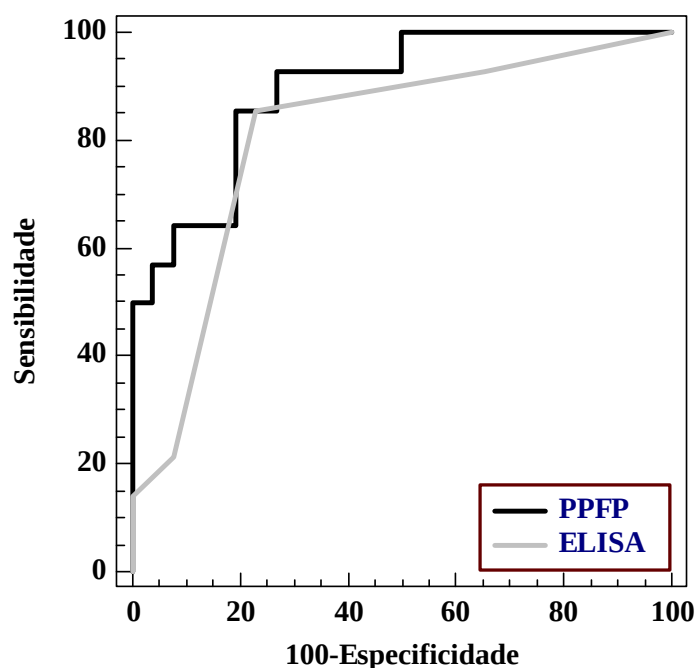


Fonte: Realizado pela autora utilizando o programa MedCalc Statistical.

5.6. Análise das curvas ROC entre ELISA e Citometria de Fluxo

Os valores dos resultados dos títulos de ELISA e citometria de fluxo foram utilizados a fim de se construir as curvas ROC para os testes (Figura 13). Com a análise das curvas ROC, observamos que área sobre a curva (ASC) do ELISA ($ASC=0,808$; $IC_{95\%}= 0,652-0,915$) diferiu daquele observado para o teste de citometria de fluxo ($ASC= 0,896$; $IC_{95\%}= 0,758-0,970$). Com isso, percebeu-se uma acurácia maior da citometria em relação ao ELISA.

Figura 13 - Comparação entre as curvas ROC de ELISA e Citometria de Fluxo.



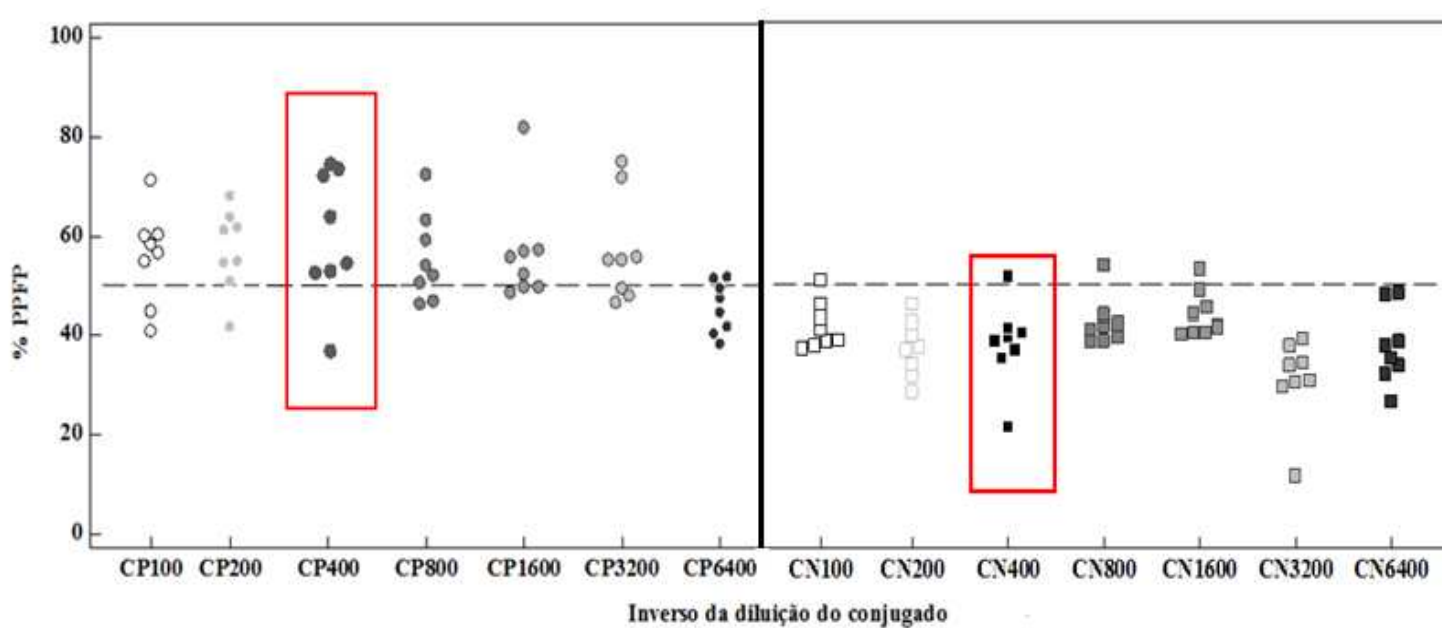
Fonte: Elaborado pela autora pelo programa MedCalc Statistical.

5.7. Padronização dos isotipos de IgG

5.7.1. Padronização do isotipo IgG1

Os soros dos pacientes que apresentaram a porcentagem de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) > 50% foram considerados positivos no ensaio de citometria de fluxo. A reatividade do ensaio de citometria de fluxo, foi expressa a partir das diluições testadas do conjugado IgG1 (1:100 a 1: 6400) que foram obtidas após incubação com os soros de pacientes portadores de LTA ativa (CP - controle positivo) e com soros de indivíduos provenientes de áreas não endêmicas e sem manifestações clínicas de LTA (CN - controle negativo), nas diluições de 1:64 a 1:8192, com promastigotas fixadas em condições previamente padronizadas. A diluição do conjugado que melhor discriminou os pacientes positivos dos negativos foi a diluição de 1:400, como descrito na Figura 14.

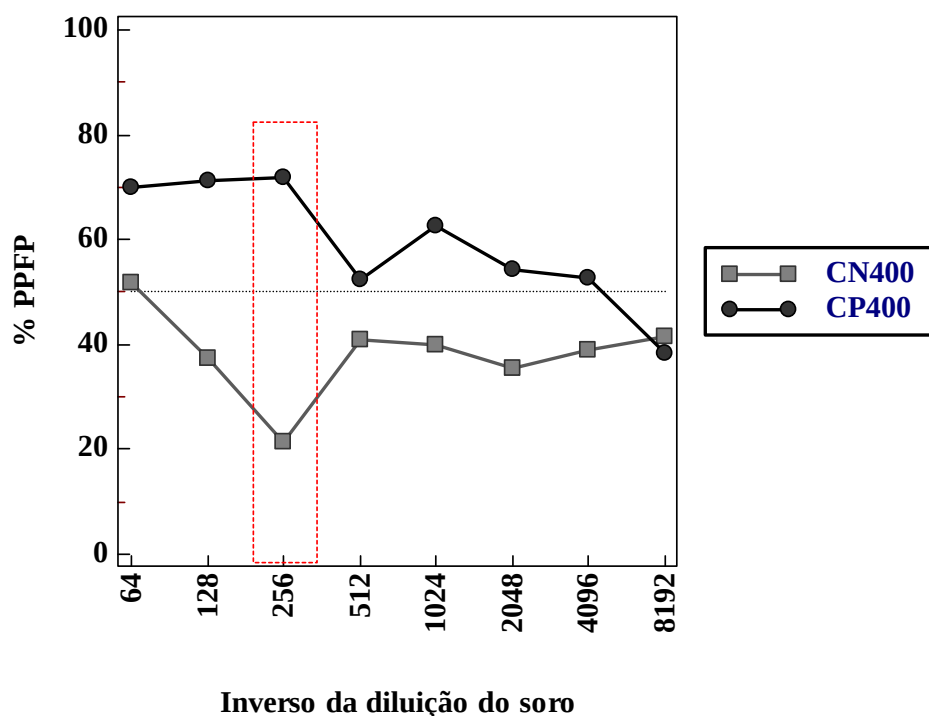
Figura 14 - Gráfico de avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG1.



Fonte: Elaborado pela autora pelo programa MedCalc Statistical. Avaliação da aplicabilidade do ensaio de citometria de fluxo na identificação da diluição de 1:400 do isotipo IgG1, a partir dos soros de pacientes portadores de LTA ativa (CP- controle positivo) e de indivíduos residentes de área não endêmica e sem manifestações clínicas da doença (CN- controle negativo) nas diluições de 1:64 a 1:8192.

A análise da curva de titulação do anticorpo IgG1 anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes controles (positivo e negativo), expressos como os valores de PPFP, sugerem que a diluição 1:256 é a região (R) de reatividade que corresponde ao primeiro título de reação diferencial entre os indivíduos AT (Figura 15).

Figura 15 - Curvas de titulação na diluição 1:400 do isotipo IgG1.



Fonte: Elaborado pela autora. Curvas de titulação de anticorpos IgG1 anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes classificados quanto a presença de lesão (CP) e sem manifestação clínica (CN). A linha tracejada corresponde ao ponto de corte de 50% de PPFP.

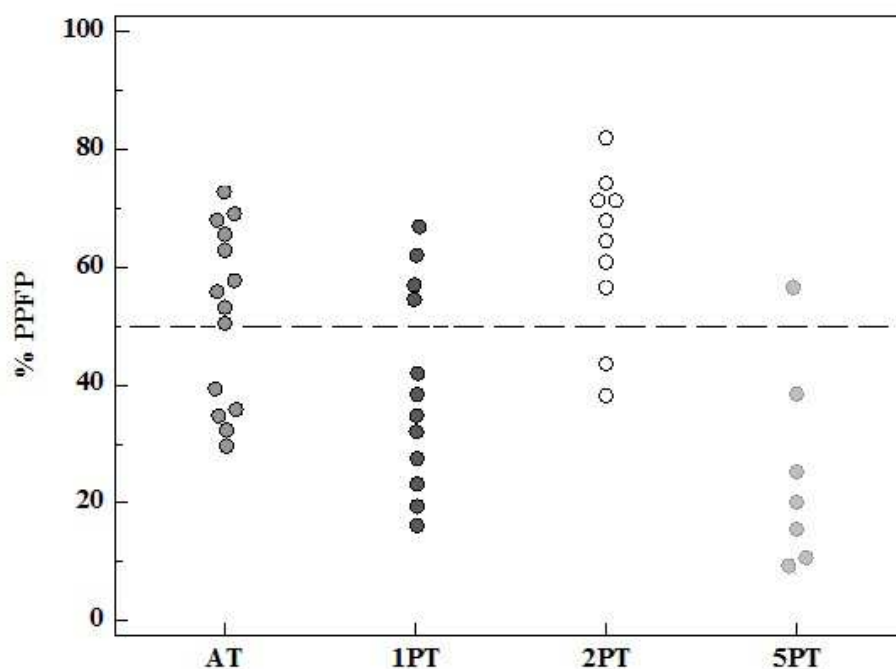
Após a escolha da diluição para o conjugado IgG1, de 1:400, utilizando a diluição do conjugado (PE) de 1:100, foi possível confirmar que os resultados na diluição de 1:256 do anticorpo IgG1 anti-formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram os que discriminaram melhor os pacientes CP de CN.

5.7.1.2. Avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG1

Após identificar a região de reatividade e o ponto de corte, prosseguimos com a confirmação da aplicabilidade do ensaio na identificação de pacientes positivos e negativos para LTA. Observou-se que nos pacientes AT, 63,2% foram positivos; nos pacientes um ano após tratamento, 17,7%; dois anos após tratamento, 72,8% e nos

pacientes cinco anos após o tratamento, 12,5% foram positivos. Estes resultados podem ser observados na Figura 16.

Figura 16 - Avaliação da aplicabilidade do ensaio de citometria de fluxo utilizando o anticorpo IgG1 na identificação de pacientes com LTA ativa.

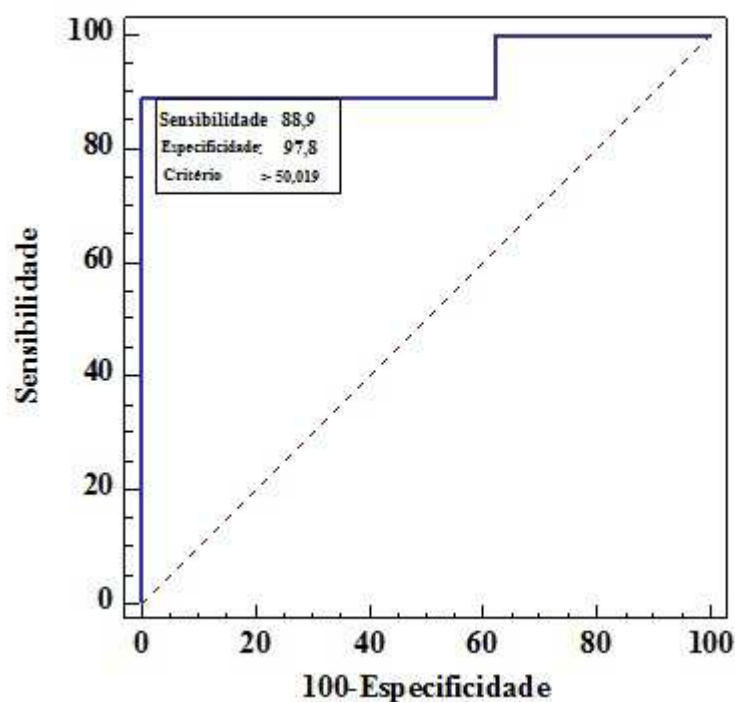


Fonte: Realizado pela autora através dos dados da pesquisa no programa MedCalc Statistical.

5.7.1.3 Estudo da curva ROC

Os valores dos resultados dos títulos da citometria de fluxo, na diluição dos soros controles de 1:256, foram utilizados a fim de se construir a curva ROC para avaliar a acurácia do teste (Figura 17). Com a análise da curva ROC, observamos que ASC para o teste de citometria de fluxo (ASC= 0,931; IC_{95%}= 0,698-0,997), mostrando que o teste obteve um excelente desempenho.

Figura 17 - Curva ROC para o isotipo IgG1.

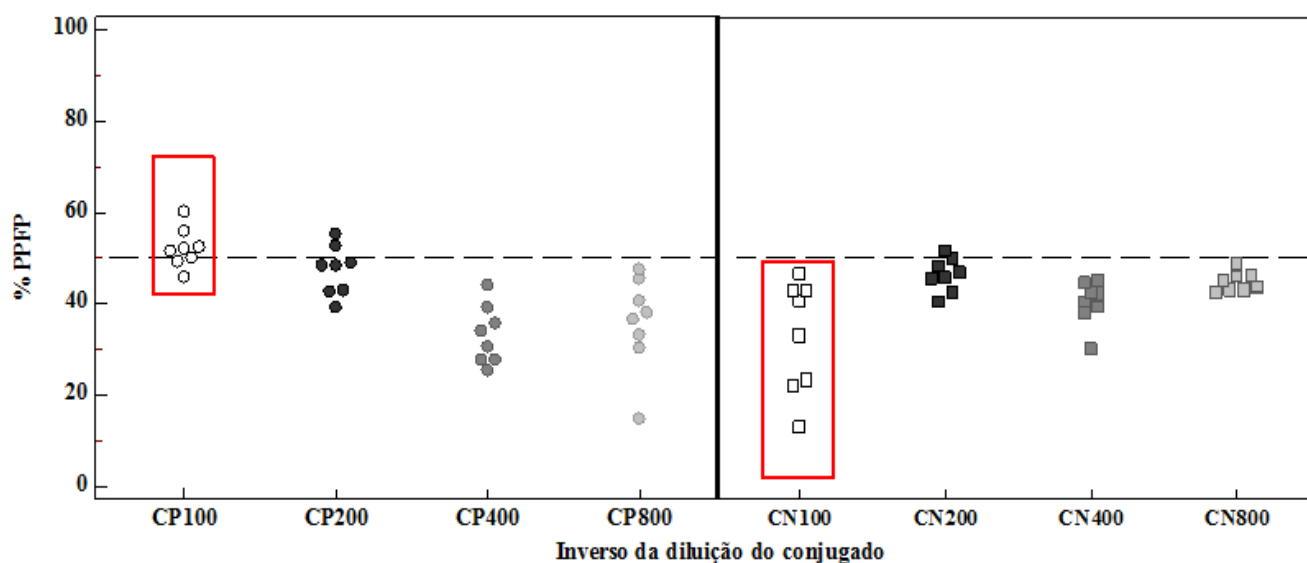


Fonte: Elaborado pela autora. Curva ROC da citometria de fluxo para o isotipo IgG1, construída a partir do desempenho, sensibilidade e 100- especificidade do teste avaliado. A área sob a curva que corresponde a ASC= 0.931.

5.7.2 Padronização do Isotipo IgG2

Os soros que também apresentaram PPFP > 50% foram considerados positivos neste ensaio. A reatividade do ensaio de citometria de fluxo, foi expressa a partir das diluições testadas do conjugado IgG2 (1:100 a 1: 800) obtidas após incubação com os soros de pacientes portadores de LTA ativa (CP -grupo controle positivo) e soros de indivíduos não infectados, de área não endêmica e sem manifestação clínica de LTA, ou seja, sem lesão (CN- grupo controle negativo), nas diluições de 1:64 a 1:8192, com promastigotas fixadas nas condições previamente padronizadas. A diluição do conjugado que melhor discriminou os grupos avaliados foi a diluição de 1:100, como descrito na Figura 18.

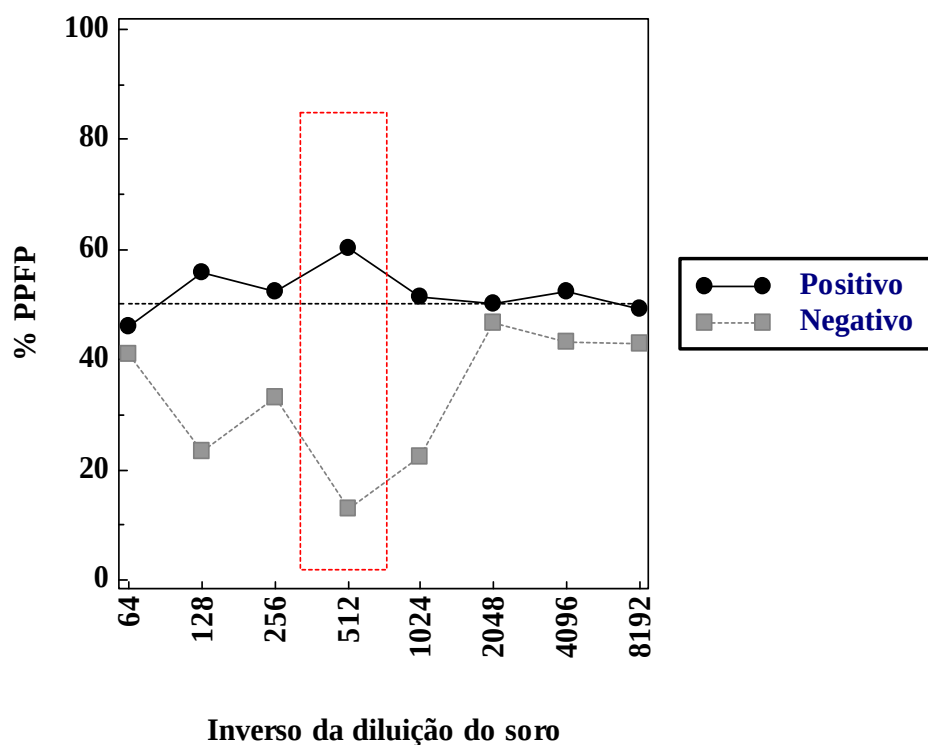
Figura 18 - Gráfico de avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG2.



Fonte: Elaborado pela autora. Avaliação da aplicabilidade do ensaio na identificação da diluição de 1:100 do isotipo IgG2, a partir de soros de pacientes com LTA ativa (CP- controle positivo) e de indivíduos de área não endêmica e sem manifestação clínica (CN – controle negativo) nas diluições 1:64 a 1:8192.

A análise da curva de titulação do anticorpo IgG2 anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes controles, expressos como os valores de PPFP, sugerem que a diluição 1:512 é a região (R) de reatividade que corresponde ao primeiro título de reação diferencial entre os indivíduos AT (Figura 19).

Figura 19 - Curvas de titulação do isotipo IgG2 na sua diluição 1:100.

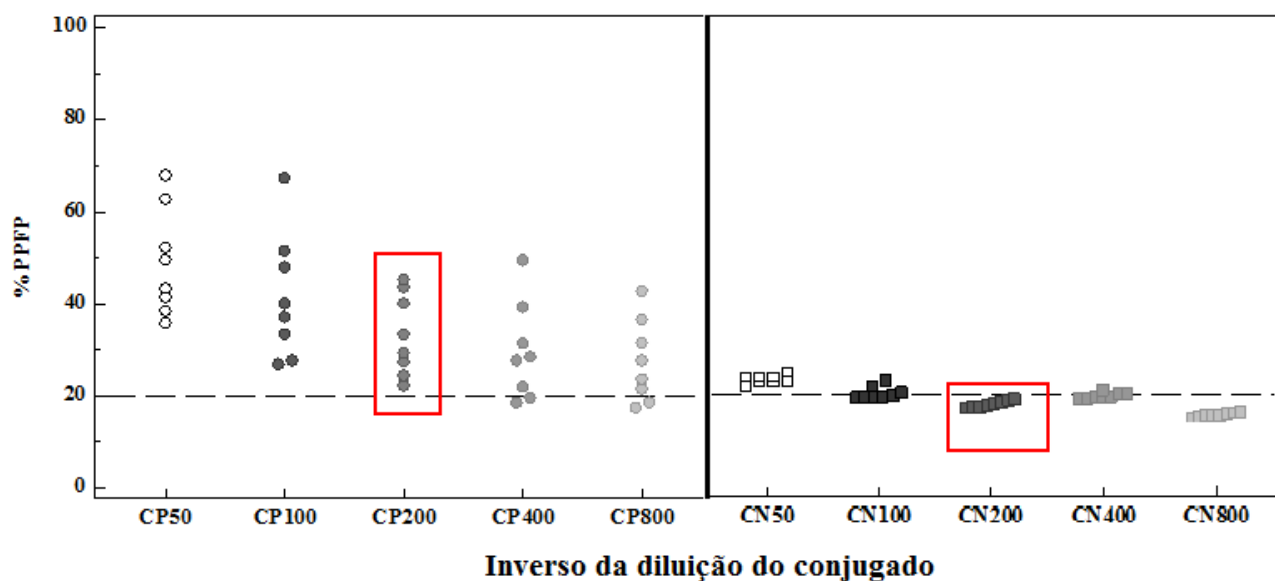


Fonte: Elaborado pela autora. Curvas de titulação de anticorpos IgG2 anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes classificados quanto a presença de lesão (CP) e sem manifestação clínica (CN). A linha tracejada corresponde ao ponto de corte de 50% de PPFP.

5.7.3. Padronização do isotipo IgG3

Os soros que apresentaram PPFP > 50% foram considerados positivos. Como para os demais isotipos, a reatividade do ensaio de citometria de fluxo, foi expressa a partir das diluições testadas do conjugado IgG3 (1:50 a 1: 800) obtidas após incubação com os soros CP e CN nas diluições de 1:64 a 1:8192, nas condições previamente padronizadas. A diluição do conjugado que melhor discriminou os grupos avaliados foi a diluição de 1:200, como descrito na Figura 20.

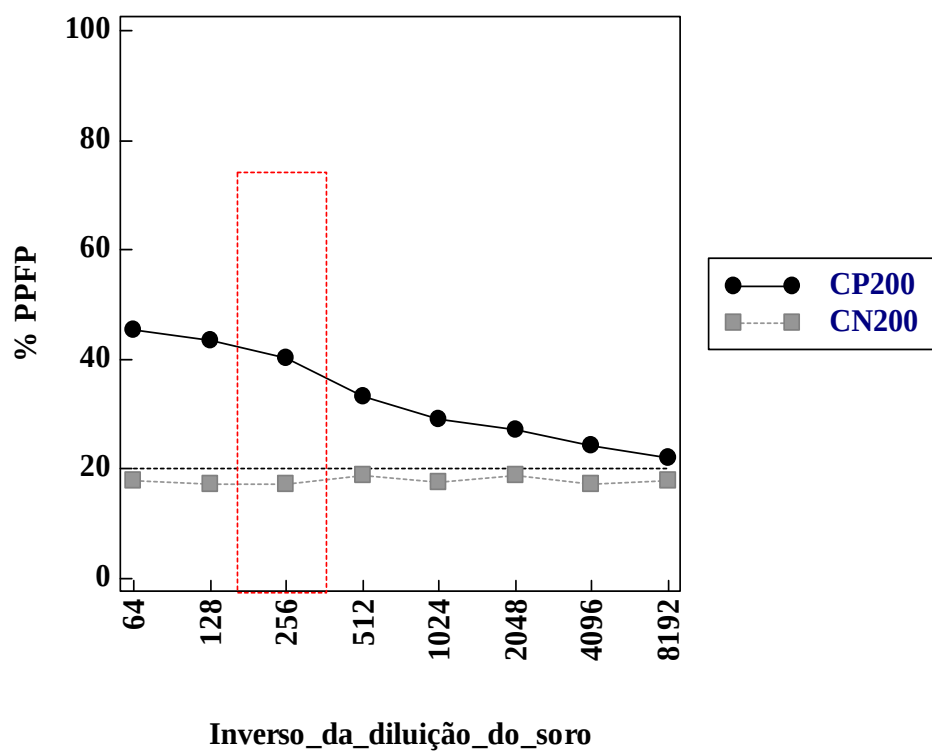
Figura 20 - Gráfico de avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG3.



Fonte: Elaborado pela autora. Avaliação da aplicabilidade do ensaio de citometria de fluxo na identificação da diluição de 1:200 do isotipo IgG3, a partir dos soros de indivíduos portadores de LTA ativa (CP – controle positivo) e de indivíduos de área não endêmica (CN- grupo controle negativo) nas diluições 1:64 a 1:8192.

A análise da curva de titulação do anticorpo IgG3 anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes controles, expressos como os valores de PFP, sugerem que a diluição 1:256 é a região (R) de reatividade que corresponde ao primeiro título de reação diferencial entre os indivíduos AT (Figura 21).

Figura 21 - Curvas de titulação do isotipo IgG3 na sua diluição 1:200.



Fonte: Elaborado pela autora. Curvas de titulação de anticorpos IgG3anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes classificados quanto a presença de lesão (CP) e sem manifestação clínica (CN). A linha tracejada corresponde ao ponto de corte de 50% de PPFP.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho propusemos o uso da citometria de fluxo como uma ferramenta alternativa para o diagnóstico e também para o critério de cura da LTA através do uso dos isotipos de imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Como descrito por Pissinate et al., 2008, os isotipos de IgG, principalmente IgG1 e IgG3, aumentam a eficiência da técnica. Além disso, após a caracterização da população de estudo fizemos uma comparação do desempenho e acurácia da citometria de fluxo com a imunofluorescência indireta (IFI) e o ELISA, testes sorológicos utilizados na rotina nos centros de referência.

A citometria de fluxo se mostrou uma ferramenta mais sensível e específica do que a IFI, como pôde ser observado através da análise das curvas ROC. A ASC da IFI ($ASC=0,8$; $IC_{95\%}= 0,78-0,99$) diferiu daquele observado para o teste de citometria de fluxo ($ASC= 0,9$; $IC_{95\%}= 0,75-0,99$). Com isso, a acurácia para o teste de IFI foi menor em relação ao teste de citometria de fluxo, mostrando que quando este teste for validado, pode ser um candidato à rotina laboratorial de diagnóstico.

A sensibilidade de IFI que foi encontrada neste trabalho foi semelhante à resultados obtidos de outros estudos (ROMERO *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2007; SZARGIKI *et al.*, 2009) e embora a sua sensibilidade tenha sido semelhante à da citometria de fluxo, foi relatado que essa característica da IFI para as formas cutâneas de *L. (V.) braziliensis* pode apresentar variações de 50 a 80% (MARZOCHI, 1992).

Gontijo et al., 2002 reportaram uma reatividade de 21,5% para IFI em indivíduos sem manifestações clínicas para LTA e que eram residentes de área não endêmica para a doença. Dessa forma, atribuímos os resultados falso-positivos na citometria de fluxo à possibilidade de reinfecção, já que estes indivíduos residem em áreas endêmicas e são imunologicamente sensibilizados (ROCHA *et al.*, 2006). Ainda assim, não podemos descartar a possibilidade de reações cruzadas com outros tripanosomatídeos. Pereira et al., 2012 demonstraram que técnicas que obtiveram alta especificidade precisaram ajustar a sua metodologia para melhorar seus desempenhos como ferramentas de confirmação diagnóstica.

Em relação à comparação das curvas ROC da citometria com o teste de ELISA, foi verificado um melhor desempenho do primeiro teste em relação ao segundo, onde os resultados foram $ASC= 0,9$; $IC_{95\%}= 0,75-0,99$ para a citometria e $ASC = 0,808$; $IC_{95\%}=$

0,652-0,915 para o ELISA. A citometria de fluxo também se mostra superior a esta técnica devido a outros fatores, como uma menor sensibilidade, especificidade e baixa reprodutibilidade do ELISA em relação a citometria. Além disso, também existem relatos de reações cruzadas com outros tripanosomatídeos, e que, assim como foi observado no presente estudo, há ausência de correlação entre níveis de anticorpos circulantes com a presença de infecção ativa (PASSOS *et al.*, 2000; SCHALLIG; OSKAM, 2002; SAVANI *et al.*, 2003).

No que diz respeito à padronização e à utilização do isotipo IgG1 por citometria de fluxo, diante da região de reatividade escolhida, foi possível observar através das análises da curva ROC, um valor da ASC = 0,931, mostrando excelentes resultados de especificidade e sensibilidade, onde seu intervalo de confiança foi IC_{95%}=0,698-0,997. Com relação a avaliação da aplicabilidade, foi visto que antes do tratamento, 36,8% dos pacientes foram negativos; em pacientes um ano após tratamento, 82,3% foram negativos; dois anos após o tratamento, 27,2% e nos pacientes cinco anos após o tratamento, 87,5%. Esses resultados mostram que mesmo necessitando de um maior número de amostras, essa abordagem abre perspectivas para o seu uso no diagnóstico e bem como no critério de cura da doença.

Para a padronização dos isotipos IgG2 e IgG3, foi possível discriminar os pacientes positivos dos negativos, as diluições do conjugado para cada isotipo foram de respectivamente 1:100 e 1:200 e as diluições do pool de soros utilizados como controles positivo e negativo foram 1:512 e 1:256. Devido a dificuldades com relação a manutenção das culturas de *L. (V.) braziliensis* e ao fato da baixa quantidade sérica destes isotipos (inferior ao isotipo IgG1) (SOUZA *et al.*, 2005; ABBAS *et al.*, 2015), não foi possível realizar a avaliação da aplicabilidade. Como anteriormente mencionado, não foi possível realizar a padronização do isotipo IgG4, devido às baixas quantidades séricas presentes e por não termos amostras da forma difusa na região Nordeste.

Teixeira-Carvalho *et al.*, 2014 apresentaram semelhantes valores de ponto de corte de PPFP comparados a este trabalho. Foram utilizadas promastigotas fixadas de *L. (V.) braziliensis*. O uso de parasitas fixados é um recurso viável para estocar uma grande quantidade de antígeno, contribuindo para a sua produção em larga escala (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013). Além disso, o risco de infecção na manipulação é reduzido, reforçando o uso de preparações fixadas como fonte de antígeno para testes sorológicos.

Embora a maioria das metodologias que empregam a citometria de fluxo como ferramenta diagnóstica seja considerada cara em relação a outros métodos convencionais, como ELISA e IFI, há alguns anos muitos laboratórios clínicos investiram na aquisição de um citômetro de fluxo por causa de seu uso frequente em muitas sub-áreas diferentes das ciências biológicas e da saúde (NAKAGE *et al.*, 2005). A expansão do uso da citometria de fluxo irá auxiliar, em um futuro próximo, no uso de novas metodologias em laboratórios convencionais, proporcionando uma troca maior de informações entre os centros de pesquisa de desenvolvimento tecnológico e a rotina laboratorial.

De maneira geral, a análise global dos resultados obtidos sugere que a citometria de fluxo aplica-se ao rastreamento da LTA como parte da pesquisa em pacientes e que a utilização do isotipo IgG1 tem grandes possibilidades para contribuir como um método mais específico do que os convencionais. Ainda são necessários mais estudos no que diz respeito aos isotipos IgG2 e IgG3, devem ser realizados experimentos com um maior número de amostras, porém, como já foi visto, essa área tem grandes perspectivas na detecção e caracterização da doença nos pacientes (SOUZA *et al.*, 2005; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015).

Devido a limitações, como a quantidade de soros com outras formas clínicas como a forma disseminada e difusa, não foi possível padronizar o isotipo IgG4 e realizar a avaliação da aplicabilidade dos isotipos IgG2 e IgG3 na detecção de pacientes com doença ativa e curados após tratamento. Porém, os dados obtidos abrem portas para a utilização desta metodologia como uma alternativa ao diagnóstico convencional.

Em um estudo anterior de nosso grupo de pesquisa, um artigo já foi publicado mostrando a comparação entre Citometria e IFI, comprovando o melhor desempenho e acurácia da citometria (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013), corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

Sendo assim, podemos afirmar que a citometria de fluxo tem grandes possibilidades de se tornar uma técnica alternativa para o diagnóstico da doença quando validada, e que também, tem grandes chances para atuar como critério de cura laboratorial da LTA.

7 CONCLUSÕES

- A citometria de fluxo aplica-se ao diagnóstico da LTA, uma vez que apresentou resultados positivos na presença da doença;
- Através das análises das curvas ROC, verificamos que a citometria foi superior aos dois testes sorológicos utilizados na rotina laboratorial para LTA;
- Possibilidade de utilizar a metodologia como critério de cura, uma vez que foi possível, através do ponto de corte empregado, distinguir pacientes com doença ativa dos curados;
- São necessários mais estudos com os isotipos IgG2, IgG3 e IgG4 de forma que possam ser avaliadas suas aplicabilidades;
- Podemos afirmar, com os dados obtidos até o momento, que o isotipo IgG1 também pode ser aplicado ao diagnóstico da LTA, uma vez que se apresentou positivo em pacientes com a forma ativa;
- O presente trabalho pôde contribuir para uma maior compreensão da LTA em seus aspectos imunológicos e relacionados ao diagnóstico, trazendo a citometria de fluxo como uma técnica possível de ser empregada na rotina laboratorial.

8 PERSPECTIVAS

- Aumentar o número de amostras para validar o ensaio de citometria de fluxo na pesquisa de anticorpos IgG e IgG1 anti-formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*;
- Padronizar o isotipo IgG4 e avaliar a aplicabilidade dos isotipos IgG2 e IgG3;
- Verificar a presença de reações cruzadas no ensaio de citometria de fluxo em pacientes com doenças que se assemelham clinicamente à Leishmaniose Tegumentar Americana e à doenças provocadas por protozoários da mesma família que a *Leishmania* spp.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015. ISBN 853528320X.

ALMEIDA, A. F. C., M.C.A.B; OLIVEIRA, A.P.; SOUZA, M.A.; PEREIRA, V.R.A. Immunophenotypic characterization of patients with American cutaneous leishmaniasis prior to and after treatment in Pernambuco, Brazil

Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 17, n. 2, p. 230-234, 2011.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ALVES, W. A. B., P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, Jan/Fev 2004.

AMATO, V. S. D., M.I.; NICODEMO, A.C.; DE CARVALHO L.V.; PAGLIARI, C.; DA MATTA V.L.; DE OLIVEIRA L.S.; DE CASTRO, S.M.; UIP, D.E.; AMATO, J.G.; AMATO NETO, V. An evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 23-30, Jan/Fev 1998.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.

ANDRADE, M. S. B., M.E.F.; SILVAI, S.T.; LIMA, B.S.; ALMEIDA, E.L.; ALBUQUERQUE, E.L.; MARINHO-JÚNIOR, J.F.; ISHIKAWA, E.; CUPOLILLO, E.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 229-233, 2005.

BACELLAR, O. L., H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO-DE-JESUS, A.; DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; CARVALHO E.M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, Dez 2002.

BASANO, S. A. C., L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328-337, 2004.

BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nature Reviews**, v. 7, p. 875-888, 2007.

BENSOUSSAN, E. N., A.; JONAS, F.; SCHNUR, L.F.; JAFFE, C.L. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1435-1439, Abr 2006.

BITTENCOURT, A. C. S., A.; ANDRADE, Z.A. Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescência na leishmaniose tegumentar. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 10, p. 247-252, 1968.

BOMFIM, G. et al. Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 5, p. 854-859, 2007.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of The Royal Medicine Hygiene**, v. 93, p. 488-494, 1999.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: eco-epidemiological aspects in 'Zona da Mata' region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 445-449, 1994.

BRASIL. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2.ed.** 2007

BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. D. A., A.F.; DE OLIVEIRA, A.P.; DE ASSIS-SOUZA, M.; DA ROCHA, L.F.; PEREIRA, V.R.A. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular Immunology**, v. 279, n. 2, p. 180-186, 2012.

BRITO, M. et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 2, p. 203-206, 2001.

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, v. 14, n. 10, p. 1278-1286, 2009.

BRITO, M. E. F. et al. Human cutaneous leishmaniasis due to a new enzymatic variant of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* occurring in Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 4, p. 633-634, 1993.

BRITO, M. E. F. et al. Identification of Potentially Diagnostic *Leishmania braziliensis* Antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot Analysis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 7, n. 2, p. 318-321, 2000.

CELESTE, B. et al. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 11, p. 1591-1593, 2004.

COFFMAN, R. L.; CARTY, J. AT cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. **The Journal of Immunology**, v. 136, n. 3, p. 949-954, 1986.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and molecular pathology**, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

DE ASSIS SOUZA, M. et al. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. **Microbial pathogenesis**, v. 57, p. 27-32, 2013.

DE MOURA, T. R. et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 9, p. 5827-5834, 2005.

DE OLIVEIRA, A. P. et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* immunoglobulin G. **J Immunol Methods**, v. 387, n. 1-2, p. 245-53, Jan 31 2013.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & bioscience**, v. 5, n. 1, p. 1, 2015.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 08, p. 961-972, 2014.

FAGUNDES-SILVA, G. et al. Decrease in anti-Leishmania IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. **Parasite immunology**, v. 34, n. 10, p. 486-491, 2012.

FALDYNA, M. et al. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs—a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 82, n. 1, p. 23-37, 2001.

FUNASA. **Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana**. Ministério da Saúde, 2000.

GASCAN, H. et al. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. **The Journal of experimental medicine**, v. 173, n. 3, p. 747-750, 1991.

GENARO, O.; NEVES, D. Leishmaniose tegumentar americana. **NEVES, DP Parasitologia Humana**, v. 10, p. 36-53, 1998.

GOMES, C. M. et al. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 5, p. 701-709, 2014.

GOMES, M. L. et al. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 60, n. 2, p. 205-210, 1999.

GONÇALVES, C. C. M. et al. Evaluation of antigens from various Leishmania species in a Western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 66, n. 1, p. 91-102, 2002.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. D. L. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GRIMALDI, G.; TESH, R. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

GUARÍN, N. et al. Comparative immunohistological analysis of the Montenegro skin test reaction in asymptomatic infection and in acute and chronic cutaneous leishmaniasis. **Biomedica**, v. 26, p. 38-48, 2006.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against Leishmania infections. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1286-1294, 2015.

HUSSAIN, R.; KIFAYET, A.; CHIANG, T. J. Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies are markers of progressive disease in leprosy. **Infection and immunity**, v. 63, n. 2, p. 410-415, 1995.

JANI, I. V. et al. Multiplexed immunoassays by flow cytometry for diagnosis and surveillance of infectious diseases in resource-poor settings. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 4, p. 243-250, 2002.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical reviews in microbiology**, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.

KAWANO, Y.; NOMA, T.; YATA, J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. **The Journal of Immunology**, v. 153, n. 11, p. 4948-4958, 1994.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis vaccine: where are we today? **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 177, 2010.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. **Hum Vaccin**, v. 7, n. 11, p. 1204-14, Nov 2011.

KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1544-1562, 2014.

KITANI, A.; STROBER, W. Regulation of C gamma subclass germ-line transcripts in human peripheral blood B cells. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 7, p. 3478-3488, 1993.

KURNIAWAN, A. et al. Differential expression of IgE and IgG4 specific antibody responses in asymptomatic and chronic human filariasis. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 9, p. 3941-3950, 1993.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New world leishmaniasis. **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**, 2005.

LIMA, H. C.; DEKREY, G. K.; TITUS, R. G. Resolution of an infection with *Leishmania braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *Leishmania major* in BALB/c mice. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, 1999.

LIRA, R. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos e IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos. **Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Saúde Coletiva**, 2005.

LUND, F. E. Cytokine-producing B lymphocytes—key regulators of immunity. **Current opinion in immunology**, v. 20, n. 3, p. 332-338, 2008.

MACHADO, P. E. **Comparação dos métodos parasitológico, imunológico e molecular na detecção de Leishmaniose Tegumentar Americana no estado de Santa Catarina**. 2004. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

MARTINS-FILHO, O. A. et al. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 2, n. 5, p. 569-573, 1995.

MARTINS, L.; ALEXANDRINO, A.; GUIMARÃES, G. Detection of *Leishmania braziliensis* DNA in American tegumentary leishmaniasis patients. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 3, p. 571-574, 2010.

MARZOCHI, M. C. D. A. Curso-Doenças infecto-parasitárias: leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **J. bras. Med**, v. 63, n. 5/6, p. 82-104, 1992.

MAZUMDER, S. et al. Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/protein and protein/protein based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e14644, 2011.

MENDONÇA, M. G. et al. Persistence of Leishmania parasites in scars after clinical cure of american cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 6, p. 1018-1023, 2004.

MUTISO, J. M. et al. Development of Leishmania vaccines: predicting the future from past and present experience. **J Biomed Res**, v. 27, n. 2, p. 85-102, 2013.

NAKAGE, A. P. M. et al. Flow cytometry methodology and application in the veterinary hematology. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 966-973, 2005.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. **Revista Percursos**, v. 6, n. 1, p. 147-168, 2014.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. Atheneu, 2002. ISBN 8573792434.

O'NEIL, C.; LABRADA, M.; SARAIVA, N. Leishmania (Viannia) panamensis-specific IgE and IgA antibodies in relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 49, n. 2, p. 181-188, 1993.

OLIANI, J. **Estudo químico e avaliação das atividades antiprotzoária e antimicobacteriana in vitro dos alcalóides isoquinolínicos e do óleo volátil de Annona crassiflora Mart. (Annonaceae)**. 2012. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OMS. **Control of the Leishmaniasis: Report of a WHO Expert Committee**. World Health Organization, 1990. ISBN 9241207930.

_____. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. 2010.

_____. Leishmaniasis Fact sheet N 375. **World Health Organization, Geneva, Switzerland**. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en>, 2013.

OUAAZ, F. et al. Role of IgE immune complexes in the regulation of HIV-1 replication and increased cell death of infected U1 monocytes: involvement of CD23/Fc epsilon RII-mediated nitric oxide and cyclic AMP pathways. **Molecular Medicine**, v. 2, n. 1, p. 38, 1996.

OZBILGE, H. et al. IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. **Journal of medical microbiology**, v. 55, n. 10, p. 1329-1331, 2006.

PALMA, G. I.; SARAVIA, N. G. In situ characterization of the human host response to *Leishmania panamensis*. **The American journal of dermatopathology**, v. 19, n. 6, p. 585-590, 1997.

PASSOS, V. et al. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 8, p. 968-974, 2000.

PEDRAS, M. J. et al. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 47, n. 3, p. 477-485, 2003.

PEREIRA, V. R. et al. Evaluation of anti-living and anti-fixed *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 74, n. 3, p. 292-8, Nov 2012.

PERLMANN, P. et al. Immunoglobulin E, a pathogenic factor in *Plasmodium falciparum* malaria. **Infection and immunity**, v. 65, n. 1, p. 116-121, 1997.

PINHEIRO, R.; AMERICANA, L. T. **mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia**: Infarma 2004.

PINHEIRO, R. O. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: MECANISMOS IMUNOLÓGICOS, TRATAMENTO E PROFILAXIA. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 16, n. 7/8, p. 79-82, 2013.

PISSINATE, J. F. et al. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Journal of immunological methods**, v. 336, n. 2, p. 193-202, 2008.

POURMOHAMMADI, B. et al. Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Iranian journal of parasitology**, v. 5, n. 4, p. 1, 2010.

REIS, L. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, p. 103-116, 2007.

REIS, L. C. et al. Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 23, n. 1, p. 63-69, 2009.

REIS, L. D. C. **Caracterização da resposta imune celular em portadores de leishmaniose tegumentar americana antes e após tratamento quimioterápico.** 2007. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

ROCHA, R. et al. Clinical value of anti-live *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 11, n. 2, p. 156-166, 2006.

ROCHA, R. D. R. et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 551-562, 2002.

RODRIGUES, E. H. G. **Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco.** 2000. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz

RODRIGUES, E. H. G. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I. et al. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. **Experimental parasitology**, v. 112, n. 1, p. 44-51, 2006.

RODRIGUEZ-PINTO, D.; SARAVIA, N. G.; MCMAHON-PRATT, D. CD4 T cell activation by B cells in human *Leishmania* (*Viannia*) infection. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

RODRIGUEZ, V.; CENTENO, M.; ULRICH, M. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. **Parasite immunology**, v. 18, n. 7, p. 341-345, 1996.

ROMERO, G. A. S. et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* or *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in Brazil. **Acta tropica**, v. 93, n. 1, p. 49-56, 2005.

RONET, C. et al. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. **The journal of immunology**, v. 184, n. 2, p. 886-894, 2010.

ROSSI-BERGMANN, B.; MÜLLER, I.; GODINHO, E. TH1 and TH2 T-cell subsets are differentially activated by macrophages and B cells in murine leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 61, n. 5, p. 2266-2269, 1993.

ROUQUAYROL, M.; ALMEIDA FILHO, N. Elementos de metodologia para pesquisa epidemiológica. **Epidemiologia e saúde**, v. 5, p. 141-147, 2003.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. **Nature immunology**, v. 4, n. 1, p. 10-11, 2003.

SÁNCHEZ-SAMPEDRO, L. et al. High quality long-term CD4⁺ and CD8⁺ effector memory populations stimulated by DNA-LACK/MVA-LACK regimen in *Leishmania major* BALB/c model of infection. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38859, 2012.

SAVANI, E. S. M. M. et al. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 2, p. 260-262, 2003.

SCHALLIG, H. D.; OSKAM, L. Review: molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine & International Health**, v. 7, n. 8, p. 641-651, 2002.

SCHUBACH, A. et al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 3, p. 911-914, 1998.

SCOTT, P. et al. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **The Journal of experimental medicine**, v. 168, n. 5, p. 1675-1684, 1988.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International journal for parasitology**, v. 27, n. 10, p. 1135-1145, 1997.

SKEIKY, Y. et al. Association of *Leishmania* heat shock protein 83 antigen and immunoglobulin G4 antibody titers in Brazilian patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 65, n. 12, p. 5368-5370, 1997.

SOUSA, S. et al. Development of a fluorescent based immunosensor for the serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and flow cytometry. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2371, 2013.

SOUZA, M. A. D. et al. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 38, n. 2, p. 137-41, 2005.

STAVNEZER, J.; KANG, J. The surprising discovery that TGF β specifically induces the IgA class switch. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 1, p. 5-7, 2009.

SZARGIKI, R. et al. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47-52, 2009.

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 3, n. 5, p. 657-667, 2003.

TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: A Multiplexed Flow Cytometry Method for Differential Serological Diagnosis of Chagas Disease and Leishmaniasis. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0122938, 2015.

THOMAS, B. N.; BUXBAUM, L. U. Fc γ RIII mediates immunoglobulin G-induced interleukin-10 and is required for chronic *Leishmania mexicana* lesions. **Infection and immunity**, v. 76, n. 2, p. 623-631, 2008.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e525-e532, 2011.

TRUJILLO, C. et al. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. **Immunology letters**, v. 70, n. 3, p. 203-209, 2000.

ULRICH, M. et al. Differing antibody IgG isotypes in the polar forms of leprosy and cutaneous leishmaniasis characterized by antigen-specific T cell anergy. **Clinical and experimental immunology**, v. 100, n. 1, p. 54, 1995.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.

VEXENAT, A. D. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 177-185, 1996.

WANASEN, N.; XIN, L.; SOONG, L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. **International journal for parasitology**, v. 38, n. 3, p. 417-429, 2008.

WEIGLE, K. A. et al. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 601-606, 2002.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTES)

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



Centro de Pesquisas **AGGEU MAGALHÃES**

F

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente (Anexo 1)

Projeto: “Caracterização da resposta imune humoral em portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após cura clínica”.

Eu,, concordo em participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Fui informado que o objetivo principal do referido projeto é a investigação da defesa do organismo dos pacientes com leishmaniose tegumentar ativa, e após a cura clínica espontânea ou após tratamento quimioterápico.

Como faço parte do grupo de pacientes, serei submetido a coleta de 10 ml de sangue venoso antes e 10 ml de sangue venoso após a cura clínica espontânea ou após tratamento quimioterápico e a exames que incluirão a intradermoreação de Montenegro, pesquisa direta; punção aspirativa, biópsia da borda da lesão ativa, imunofluorescência indireta e PCR. Todas as informações e os detalhes dos exames que serão realizados serão previamente esclarecidos para mim. Além disso, também fui informado que receberei os resultados desses exames. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos. Fui informado que a coleta de sangue é um método invasivo, por isso pode causar desconforto no local, na hora da picada e que não devo friccionar (movimento com força) o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. O esquema terapêutico com Glucantime® (remédio utilizado para o tratamento) será composto por doses de 20 mg/Kg/dia através de injeções intramusculares em ciclos de vinte a trinta dias, sendo realizado no posto de saúde do município de Moreno por funcionários qualificados (médicos, enfermeiros ou auxiliares de enfermagem). Fui informado que esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Fui informado que se ocorrer qualquer alteração em meu organismo, deverei procurar o médico do posto de saúde. Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema de defesa do organismo participam na evolução clínica de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. Antes de minha participação no referido projeto, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecida por um participante do projeto. Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo. Autorizo a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) a utilização das informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a minha identidade. Autorizo, também que o CPqAM/FIOCRUZ poderá estocar amostra biológica para posteriores estudos. Fui informado que para usar a amostra biológica estocada, um pesquisador do projeto entrará em contato comigo.

Estou ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em minha posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que eu venha a ter sobre o significado dos termos empregados no presente texto me serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que eu assine este impresso.

Assinatura do paciente

data

Endereço do sujeito da pesquisa:

Assinatura

do

médico

responsável

–

CPqAM/FIOCRUZ

data

Pesquisador responsável: Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira. Telefone para contato: 81 21012500

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil. Tel.: (081) 3301 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>.

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (15-18 ANOS)



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas AGGEU MAGALHÃES

F

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente menor (15 a 18 anos) (Anexo 2)

Projeto: “Caracterização da resposta imune humoral em portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após cura clínica”.

Eu, _____, concordo que meu filho _____ participe voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Fui informado que o objetivo principal do referido projeto é a investigação da defesa do organismo dos pacientes com leishmaniose tegumentar ativa, e após a cura clínica espontânea ou após tratamento quimioterápico. Como meu filho (a) faz parte do grupo de pacientes, será submetido a coleta de 10 ml de sangue venoso antes e 10 ml de sangue venoso após a cura clínica espontânea ou após tratamento quimioterápico e a exames que incluirão a intradermoreação de Montenegro, pesquisa direta; punção aspirativa, biópsia da borda da lesão ativa, imunofluorescência indireta e PCR. Todas as informações e os detalhes dos exames que serão realizados serão previamente esclarecidos para mim que sou responsável pelo menor. Além disso, também fui informado que como responsável pelo menor receberei os resultados desses exames. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos. Fui informado como responsável pelo menor que a coleta de sangue é um método invasivo, por isso pode causar desconforto no local, na hora da picada e que ele não deve friccionar o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. O esquema terapêutico com Glucantime® (remédio utilizado para o tratamento) será composto por doses de 20 mg/Kg/dia através de injeções intramusculares em ciclos de vinte a trinta dias, sendo realizado no posto de saúde do município de Moreno por funcionários qualificados (médicos, enfermeiros ou auxiliares de enfermagem). Fui informado que esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Fui informado como responsável pelo menor que se ocorrer qualquer alteração no organismo do menor que sou responsável, deverei procurar o médico do posto de saúde. Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema de defesa do organismo participam na evolução clínica de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. Antes da participação do menor que sou responsável no referido projeto, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecida por um participante do projeto. Estou ciente que o menor que sou responsável poderá recusar ou retirar o consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo. Como responsável pelo menor, autorizo a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) a utilização das informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a identidade do menor que sou responsável. Como responsável pelo menor, também autorizo que o CPqAM/FIOCRUZ poderá estocar amostra biológica para posteriores estudos. Como responsável pelo menor, fui informado que para usar a amostra biológica estocada, um pesquisador do projeto entrará em contato comigo. Como responsável pelo menor, estou ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em minha posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que eu venha a ter como responsável pelo menor sobre o significado dos termos empregados no presente texto me serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que eu assine este impresso.

Assinatura do responsável pelo menor

data

Endereço do sujeito da
esquisa: _____

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

data

Pesquisador responsável: Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira. Telefone para contato: 81 21012500

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil. Tel.: (081) 3301 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>.

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (GRUPO CONTROLE)



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas **AGGEU MAGALHÃES**

F

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Controle (Anexo 3)

Projeto: “Caracterização da resposta imune humoral em portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após cura clínica”.

Eu, concordo em participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal do referido projeto é a investigação da defesa do organismo dos pacientes com leishmaniose tegumentar ativa, e após a cura clínica espontânea ou após tratamento quimioterápico. Eu farei parte do grupo controle, ou seja, grupo de indivíduos que não apresentam a doença e que servirão de comparação com os indivíduos doentes. Serei submetido a uma única coleta de 10 ml sangue venoso.

Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos. Fui informado que a coleta de sangue é um método invasivo, por isso pode causar desconforto no local, na hora da picada e que não devo friccionar (movimento com força) o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo poderão ser usadas como marcadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema de defesa do organismo participam na evolução clínica de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. Como faço parte do grupo controle não serei submetido a nenhum tratamento com Glucantime® (remédio utilizado no tratamento da leishmaniose tegumentar americana). Fui informado que esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza).

Antes de minha participação no referido projeto, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecido por um participante do projeto, sobretudo em relação a importância do grupo controle. Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo. Autorizo a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) a utilização das informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a minha identidade. Autorizo, também que o CPqAM/FIOCRUZ poderá estocar amostra biológica para posteriores estudos. Fui informado que para usar a amostra biológica estocada, um pesquisador do projeto entrará em contato comigo.

Estou ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em minha posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que eu venha a ter sobre o significado dos termos empregados no presente texto me serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que eu assine este impresso.

Assinatura do voluntário

data

Endereço do sujeito da pesquisa: _____

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

data

Pesquisador responsável: Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira. Telefone para contato: 81 21012500

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil. Tel.: (081) 3301 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>.

APÊNDICE D - ARTIGO SUBMETIDO

American Tegumentary Leishmaniasis and Flow Cytometry: A review

Beatriz C. Oliveira^{1,2*}; Andresa P. O. Mendes²; Maria C. A. B. Castro^{2,3}; Valéria P. Hernandes².

¹: Universidade Federal de Pernambuco, Inovação Terapêutica, Recife, Pernambuco, Brazil.

²: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brazil.

³: Centro Acadêmico de Vitória, Núcleo de Enfermagem, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória, Pernambuco, Brazil

*Corresponding author. Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil. Tel.: 55-81-21012631, Fax: 55-81-21012640.E-mail: oliveira.cbeatriz@gmail.com

Abstract

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a parasitic disease caused by protozoans of the genus *Leishmania* and transmitted by the bite of sandflies. It is considered neglected due to its high incidence and morbidity, mainly in developing countries. The treatment for this disease besides expensive, is toxic and has limitations such as resistance, both from the parasite and the host; and invasiveness, making it not quite acceptable for some patients. There is still no available vaccine for the disease, what makes the correct diagnosis the better alternative to guide the treatment and therefore manage it. The diagnosis of suspected cases has to gather epidemiological, clinical and laboratorial data, since the disease can be misdiagnosed with other dermatological conditions. Immunological methods are commonly used for detecting and monitoring diseases, and the main techniques used in the routine for ATL are the Montenegro Skin Test, Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Immunofluorescence Assay and Western Blot. Although these approaches have good sensitivity levels, they lack on specificity and also have some limitations like crossed-reactions with another diseases caused by trypanosomatid parasites. One different serological approach, which is becoming an alternative method for the diagnosis of this disease, is Flow Cytometry; it has shown balanced levels of specificity and sensitivity and also a better accuracy when compared to other methods used in routine. Therefore, this article shows the recent

advances on the diagnosis of ATL by Flow Cytometry and by using the findings on the literature, aims to guide researchers on what should be the focus to have a better diagnostic method for this disease. **Keywords:** American Tegumentary Leishmaniasis; Flow Cytometry; Diagnosis.

INTRODUCTION

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a neglected vector-borne disease, transmitted by sand flies of the genus *Lutzomyia*. Currently, there have been reported approximately 1.5 million cases per year, comprising the two main clinical forms of the disease: cutaneous leishmaniasis (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (ML). CL is primarily found in regions of South America and Middle-East, and almost 90% of ML cases occur in Brazil, Peru and Bolivia [1,2].

Currently, according to the World Health Organization, more than 20 species of *Leishmania* capable of causing the disease have been reported [3]. CL is the most prevalent form of ATL, and it can be caused by the species: *Leishmania aethiopica* (*L. aethiopica*), *L. major* and *L. tropica* in the old world; and *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, and *L. peruviana* in the new world; and for ML, the causative species are: *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. braziliensis* and *L. guyanensis* (Figure 1).

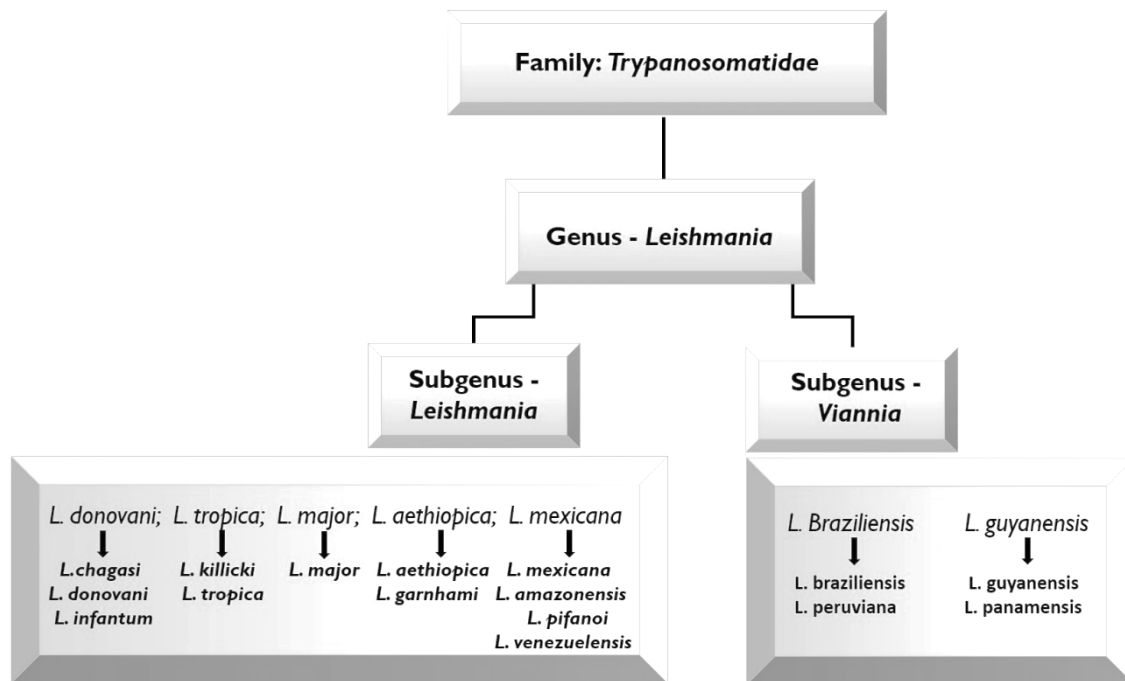


Figure 1: Etiological agents of American Tegumentary Leishmaniasis.

The clinical forms of ATL will depend on the vector, the parasite and also on the immunological and genetic features of the host [4, 5]. The infection might be asymptomatic or cause serious skin damages on the patient, ranging from localized cutaneous lesions to a destructive involvement of the nasal and oral mucosa [6] (Figure 2).

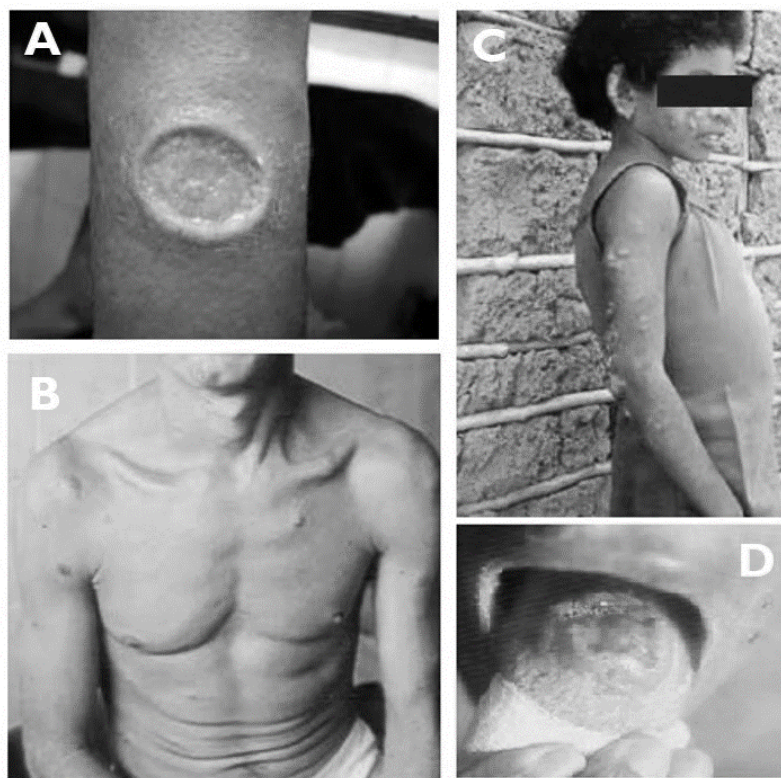


Figure 2: Clinical forms of American Tegumentary Leishmaniasis. A) Localized form; B) Disseminated form; C) Diffuse form; D) Mucocutaneous form – Rare case of involvement of the tongue. BRASIL (2007) [7].

To all clinical forms of ATL, the treatment is based on the parenteral administration of pentavalent antimonies, or when not effective, antibiotics and antifungal agents [7, 8]. This treatment presents certain level of toxicity, which can cause several side effects; also, the success index on the first cycle of treatment is only 16%. The disease does not have an efficient cure criterion, this being based solely on the complete healing of the lesion [9]. Furthermore, there are no available vaccines for the disease, in spite of the great effort being put on over the decades. There is still a lack of knowledge about *Leishmania spp.* pathogenesis as well as the complexity of the immune response which is required to eliminate the parasite. That is why an adequate treatment and the development of an efficient vaccine are not a reality yet [10, 11].

DIAGNOSIS

Due to the absence of a gold-standard method to diagnose the disease, there is a need to associate epidemiological, clinical and laboratorial aspects. In addition, the resemblance of the ATL lesions with other skin diseases makes differential diagnosis an useful tool to avoid an incorrect conclusion. Herein we discuss general features of the commonly used methods for the diagnosis of ATL focusing on those using Flow Cytometry.

Epidemiological and clinical diagnosis

For the epidemiological and clinical diagnosis it is important to have information about the habitat, leisure and work activities of the patients [12]. Also, it is useful to know if the individuals have traveled to endemic regions due to the expansion of transmission in urban areas [13]. Since ATL can be misdiagnosed with other dermatological diseases, to know where the patient comes from and where he went over the last weeks is important to know if it is a vector-borne disease, infectious disease or fungal disease.

As mentioned before, ATL presents difficulties on its clinical diagnosis due to the similarity of the lesions with different illnesses such as cutaneous tuberculosis, leprosy, tropical ulcer, syphilis, neoplasm and even some kinds of carcinomas and lymphomas [8, 14]. On ML lesions, one might observe infiltrating or vegetative ulcers [15].

The clinical diagnosis can be performed based on the characteristics of the patient's lesion associating it with the anamnesis and the epidemiological data. This diagnosis can also be complemented by the Montenegro Skin Test (MST) and by the therapeutic response. However, laboratorial methods are essential for the differential diagnosis with other diseases [7, 14].

Laboratorial diagnosis

Since there is no gold-standard method to diagnose ATL, it is based on the association between immunological, molecular and parasitological assays. Figure 3 summarizes the methods for each approach.

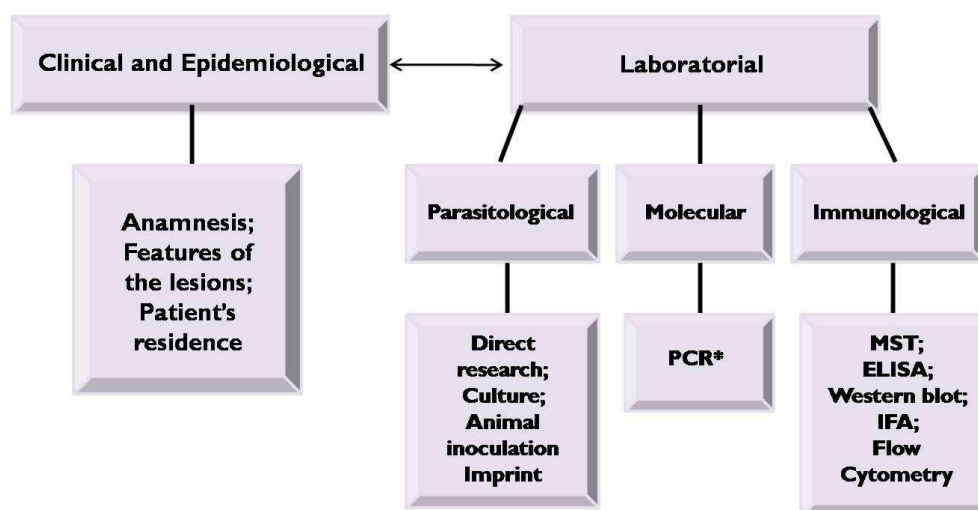


Figure 3: Simplified scheme of ATL diagnosis. *Molecular diagnosis is not normally considered in routine, despite its increasingly use in research centers.

A conclusive diagnosis is achieved when the direct research of the parasite amastigote through microscopy; the isolation of the parasites in culture medium or animal inoculation are positive [7, 16].

The direct research of the parasite can be performed using the scarified lesion, aspiration or biopsy of the lesion's edge. It is possible to visualize *Leishmania spp.* amastigotes by the method of Giemsa or Leishman [17]. This method has a sensitivity which varies from 50 to 70% [9]. The positivity of the test is inversely proportional to the time of the disease evolution. Although it is a simple technique, it has low cost, but cannot identify the parasite in all patients [18, 19].

Parasite isolation is performed in appropriate mediums, like Neal-Novy-Nicole, using obtained material from aspirative puncture or biopsies of patients lesions. The sensitivity of the culture method is usually low, around 20 to 40%. This is related mostly because of the absence of parasites in the lesions, mainly when it is *Leishmania (Viannia) braziliensis* [18,20,21]. For the *in vitro* culture, there is a inoculation in susceptible animals, such as the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Due to the long time of follow-up until the formation of the ulcer in the animal and the costs for their maintenance, this method is restricted to research institutes [7, 18, 22].

Regarding the molecular methods, the Polymerase Chain Reaction (PCR) allows the amplification of specific genes of DNA from initiator oligonucleotides (*primers*) paired specifically with the target region, therefore allowing its use as a specific instrument for the diagnosis of several infectious diseases [22, 23, 24, 25]. Although molecular

approaches have been developed for ATL diagnosis and PCR is a high sensitive and specific technique, it is a sophisticated test for laboratorial use in routine protocols, with technical requirements and still a high cost [21, 26].

The immunological diagnosis is based on the evaluation of the cellular response using the Montenegro Skin Test (MST) and/or the evaluation of the humoral response using the Indirect Immunofluorescence (IFA), Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western Blot. Currently there can be found in the literature works where Flow Cytometry appears as an alternative diagnostic tool for the disease, with advantages over the conventionally used methods [27, 28, 29, 30].

The detection of the cellular response through the MST has been employed as an important resource on the immunological diagnosis of ATL due to its high sensitivity and specificity. This test consists on the injection of an antigenic suspension of killed promastigotes to induce a late hypersensitivity response, that is evaluated after 48 to 72 hours [9, 31]. Although it can be positive in the majority of ATL cases (90%), the result is negative in recent lesions, in the diffuse form and in immunosuppressed patients. In endemic areas it is commonly positive due to the presence of subclinical infections [19, 32]. Besides that, this test does not differentiate active disease from past disease [9, 21, 33].

Routine protocols based on IFA, ELISA and Western Blot are performed for the diagnosis of ATL [34, 35, 36]. These tests present limitations, considering their lack of specificity and low reproducibility. Besides that, they might present crossed-reactions with another diseases caused by phylogenetically related species. It is also known that low levels of antibodies are observed in these tests, and there is an absence of correlation between the circulating antibody levels with the presence of an active infection [37, 38, 39, 40].

Diagnosis by Flow Cytometry

In view of the inherent difficulties of the serological techniques used on the laboratorial routine for ATL diagnosis, new methodological approaches are being developed. Flow Cytometry is a technology which allows a fast, objective and quantitative analysis of cells in suspension [41, 42]. The cells from the samples are stained with fluorochromes, allowing their identification and quantification regarding their size, granularity and

fluorescence intensity. This technique has several advantages when compared to the conventional immunoassays, such as the quantification of the analyte, use of a reduced sample volume, high reproducibility and sensitivity, and also, the possibility of multiplexing [43, 44].

This technology applied to ATL diagnosis by detecting anti-IgG antibodies against *Leishmania braziliensis* was firstly described by Rocha et al [27], where they found levels of 93.6% of sensitivity in patients who had the active form of the disease [27, 45]. This technique is based on the sensitization of 96-well plates with the patient's serum serially diluted and then on incubating it with the antigen, which can be the whole live/killed parasite or recombinant proteins bonded to micro-beads [45], furthermore, the plates are finally incubated with a secondary antibody which is bonded to a fluorochrome, allowing the visualization on the equipment [28, 29, 30, 45, 46].

A study made by Oliveira et al [28] showed that Flow Cytometry, when compared to IFA, showed a greater performance in detecting active disease and monitoring the cure of patients after treatment. This study pointed the possibility of using this technology not only to detect ATL in patients, but also to use it as a cure criterion. Having a laboratorial cure criterion would avoid discomfort to the patients, since the treatment is invasive and toxic.

More recently, a work performed by Teixeira-Carvalho [47] was able to make a differential diagnosis between Chagas Disease, American Tegumentary Leishmaniasis and Visceral Leishmaniasis. It was a triplex Flow Cytometry assay based on the detection of IgG1 antibodies against each disease. Although the protocols which were used demand high technology equipments and expensive reagents, it points to the right path researchers should follow to achieve better results in diagnosing this disease using this technology.

The use of Flow Cytometry is becoming more frequent nowadays, being easier to access this technology in almost every research institute. Although there is a limitation due to the associated cost, the benefits that comes with the positive results for society outweighs these barriers.

CONCLUSIONS

American Tegumentary Leishmaniasis is considered a neglected disease. It affects mainly developing countries, causing great morbidity in patients due to the difficult access to treatment and lack of a good healthcare system. Owing to the low income of resources to these areas, there is limited research dedicated for new diagnostic tools and also management and control of the disease.

There is an urgent need for new treatment options which are less toxic, mainly for children and those immunosuppressed patients. The available treatment is being used for more than 50 years and the mechanism of action of these drugs are still not completely known.

Vaccination remains being the best alternative to control the Leishmaniasis. The development of an efficient, safe and profitable vaccine is a global and critical priority for public health, but it is still not a reality.

Since there is no effective treatment with low toxicity and no vaccines available for ATL yet, the best way to try to control the disease is to have good diagnostic tools. These diagnostic tools would ideally detect the disease in the early stages and determine a cure criterion, within the treatment, that would allow the patients to know whether their disease is cured or not. Therefore, enhancing specificity using modern technologies like Flow Cytometry, using molecularly defined antigens and performing multiplex assays aiming differential diagnosis, is probably the best path to achieve a superior diagnostic method for a better control of the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful for our colleagues of the Immunogenetics Laboratory; Aggeu Magalhães Research Center and the Federal University of Pernambuco. We also thank the funding agencies FACEPE, CAPES and CNPq.

REFERENCES

- [1] Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, *et al.* (2014) Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 8: 961-72.
- [2] Pourmohammadi B, Motazedian M, Hatam G, Kalantari M, Habibi P, *et al.* (2010) Comparison of Three Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Iranian J Parasitol* 5: 1-8.
- [3] World Health Organization. Fact Sheet 375. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
- [4] Marzochi MCA (1992) Leishmanioses no Brasil. As leishmaniose tegumentares. *J Basic Microbiol* 63: 82-104.
- [5] Grimaldi G Jr1, Tesh RB (1993) Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6: 230-50.
- [6] Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, *et al.* (2002) Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-40.
- [7] Brasil (2007) Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Ministério da Saúde, 2.ed, Brasília, DF.
- [8] Gontijo B, Carvalho MLR (2003) Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 71-80.
- [9] Goto H, Lindoso JAL (2010) Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 419-33.
- [10] Kedzierski L (2010) Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *J Glob Infect Dis* 2: 177-85.

- [11] Mutiso JM, Macharia JC, Kiio MN, Ichagichu JM, Rikoi H, *et al.* (2013) Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. *J Biomed Res* 27:85-102.
- [12] Field V, Gautret P, Schlagenhauf P, Burchard GD, Caumes E. *et al.* (2010) Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe. *BMC Infect Dis* 10: 330.
- [13] Martins Gomes C, de Paula NA, Morais OO, Soares KA, Roselino AM, *et al.* (2014) Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol* 89: 701-11.
- [14] Neves, DP (2005) *Parasitologia humana* (10ed.), Atheneu, São Paulo.
- [15] Andrade MS, Brito ME, Silva ST, Lima BS, Almeida EL, *et al.* (2005) Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 38:229-33.
- [16] Machado PE (2004) Comparação dos métodos parasitológico, imunológico e molecular na detecção de *Leishmania* spp. em amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar americana no Estado de Santa Catarina. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- [17] Neves DP, Melo LA, Genaro O, Linardi PM (2000) *Parasitologia Humana* (10ed), Atheneu, São Paulo.
- [18] Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL (2006) Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 44:1435-9.
- [19] Vega-López F (2003) Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 16:97-101.

- [20] Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum D, Brito ME, Shaw JJ, Davies CR (1999) Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93:488-94.
- [21] Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, *et al.* (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7:581-96.
- [22] Rodrigues EHG (2000) Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brasil.
- [23] Gomes ML, Galvão LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E (1999) Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg.* 60:205-10.
- [24] Rodrigues EH, Felinto de Brito ME, Mendonça MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, *et al.* (2002) Evaluation of PCR for diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of endemicity in Northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 40:3572-6.
- [25] Singh B (1997) Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int J Parasitol* 27:1135-45.
- [26] de Assis Souza M, de Castro MC, de Oliveira AP, de Almeida AF, de Almeida TM, *et al.* (2013) Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microb Pathog* 57:27-32.
- [27] Rocha RD, Gontijo CM, Elói-Santos SM, Teixeira Carvalho A, Corrêa-Oliveira R, *et al.* (2002) Anticorpos anti-promastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados por citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 35:551-62

- [28] de Oliveira AP, de Castro MC, de Almeida AF, Souza Mde A, de Oliveira BC, *et al.* (2013) Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. *J Immunol Methods* 387:245-53.
- [29] Pissinatti JF, Gomes IT, Peruhype-Magalhães V, Dietze R, Martins-Filho OA, *et al.* (2008) Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *J Immunol Methods* 336:193-202.
- [30] Pereira VR, Reis Lde C, Souza Mde A, de Oliveira AP, de Brito ME, *et al.* (2012) Evaluation of anti-living and anti-fixed *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74:292-8.
- [31] Machado PE (2004) Comparação dos métodos parasitológico, imunológico e molecular na detecção de *Leishmania* spp. em amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar americana no Estado de Santa Catarina. Dissertação mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- [32] Reis LC (2007) Caracterização da resposta imune celular em portadores de leishmaniose tegumentar americana antes e após tratamento quimioterápico. Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brasil.
- [33] Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC (2002) PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *J Clin Microbiol* 40:601-6.
- [34] Brito ME, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FG (2000) Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:318-21.

- [35] Brito ME, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FG (2001) Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95:203-6.
- [36] Kar K (1995) Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol* 21: 123-152.
- [37] Alves WA, Bevilacqua PD (2004) Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saude Publica* 20:259-65.
- [38] Schallig HD, Oskam L (2002) Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health* 7:641-51.
- [39] Passos VM, Barreto SM, Romanha AJ, Krettli AU, Volpini AC, *et al.* (2000) American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. *Bull World Health Organ* 78:968-74.
- [40] Savani ES, Schimonsky BvBv, Camargo MC, D'auria SR (2003) Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. *Rev Saude Publica* 37:260-2.
- [41] Faldyna M, Levá L, Knötigová P, Toman M (2001) Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol* 82:23-37.
- [42] Nakage APM, Santana AE, Capua MLB, Coelho PS (2005) Flow cytometry methodology and application in the veterinary hematology. *Cienc Rural* 35: 966-73.

- [43] Sousa S, Cardoso L, Reed SG, Reis AB, Martins-Filho OA, *et al.* (2013) Development of a fluorescent based immunosensor for the serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and **flow cytometry**. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2371.
- [44] Jani IV, Janossy G, Brown DW, Mandy F (2002) Multiplexed immunoassays by flow cytometry for diagnosis and surveillance of infectious diseases in resource-poor settings. *Lancet Infect Dis* 2:243-50.
- [45] de Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RC, Pessoa-E-Silva R, Trajano-Silva LA, Gonçalves-de-Albuquerque Sda C, *et al.* (2015) Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci* 5:31.
- [46] Sousa S, Cardoso L, Reed SG, Reis AB, Martins-Filho OA, *et al.* (2013) Development of a fluorescent based immunosensor for the serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and flow cytometry. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2371.
- [47] Teixeira-Carvalho A, Campos FM, Geiger SM, Rocha RD, de Araújo FF, *et al.* (2015) FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of chagas disease and leishmaniasis. *PLoS One* 10:e0122938.

APÊNDICE E - CAPÍTULO DE LIVRO

Abstract Acceptance : eBook Entitled 'Tropical Diseases: Immunological and Molecular Tools Applied to the Epidemiology and Control' [Dr. Cavalcanti, Ref. No. 21-01-14-EBK1//EOI-35]

August 21, 2014

Dear Dr. Cavalcanti,

I am very pleased to inform you that we have received positive review reports from neutral referees and our review board for your proposed e-book entitled '***Tropical diseases: immunological and molecular tools applied to the epidemiology and control***'

You may view the author's guideline at <http://ebooks.benthamscience.com/manuscript-organization.php> that will help you in the eBook preparation. I have also enclosed the **sample chapter** which will assist you to prepare the chapters as per our format.

Pleased note that we require all non-native English speaking contributors to have the eBook /chapter checked and certified by native English speakers for language and grammar.

If you will be involving other contributors to contribute chapters in the book, you are kindly advised to engage eminent scientist largely from technologically advanced countries to contribute various chapters.

Before submitting your ebook, use the **enclosed Checklist** to make sure you have taken care of all the particulars and confirm that your book is complete and ready for submission.

In case if you need any assistance you may contact me, I will be pleased to help you in all my capacities.

Sincerely!

Humaira Hashmi
In-charge eBook Department
Editorial Manager Publications
Bentham Science Publishers
UR: <http://ebooks.benthamscience.com/>

CHAPTER 1

Epidemiological, Clinical and Laboratorial Diagnosis of the Trypanosomiasis

Rômulo Pessoa-e-Silva^{1,2}; Lays A. M. Trajano-Silva¹; Marina A. Souza¹; Beatriz C. Oliveira¹; Andresa P. O. Mendes¹; Valéria R. A. Pereira¹; Milena Paiva-Cavalcanti¹.

¹*Aggeu Magalhães Research Center, CPqAM/FIOCRUZ – PE, Recife, Pernambuco, Brazil;* ²*Central Laboratory of Public Health Dr. Milton Bezerra Sobral*

Abstract: The Trypanosomatidae family is composed by protozoan parasites responsible for causing a variety of human and non-human diseases, of varying gravities, in both new and old worlds. The distribution and adaptation of the trypanosomatids in tropical and subtropical countries, as well as the usual habitats of vectors commonly favour contamination of poor neglected populations, despite the increasing expansion to peri-urban and urban areas, thus reaching other social and economic realities. Illnesses like leishmaniasis and American trypanosomiasis (or Chagas disease) share the fact that both have a great diversity of reservoirs associated to the cycle of the parasites, which include synanthropic mammals and the *Homo sapiens* itself. Therefore, to an efficient epidemiological control, the continuous search for new human cases, as well as the monitoring and controlling of infected animals is fundamental. The laboratorial techniques routinely used for detection of these diseases may vary from simple parasitological analysis to cutting-edge molecular technology. Due to its easiness and diagnostic sensitivity, the immunology/serology is broadly applied in the laboratories and also in field, even with its limitations. The molecular biology and its tools are emerging as sensitive and specific alternative strategies for the trypanosomiasis diagnosis, but some challenges still remain, especially concerning the standardization of protocols and the establishment of gold-standard procedures. New serological and molecular methods arise annually aiming to overlap deficiencies that may reduce the feasibility for applying in routine and in epidemiological researches. In this chapter, the past and current diagnostic situation of leishmaniasis, Chagas disease and Human African trypanosomiasis (HAT) or “sleeping sickness” will be described, highlighting the technological advances and the difficulties to be faced for the next years, mainly regarding the applicability for public health.

Keywords: Leishmaniasis; American trypanosomiasis; African trypanosomiasis; Diagnosis

APÊNDICE F – PARECER COMITÊ DE ÉTICA



Título do Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após cura clínica”.

Pesquisador responsável: Valéria Rêgo Alves Pereira.

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 20/11/12

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 38/12

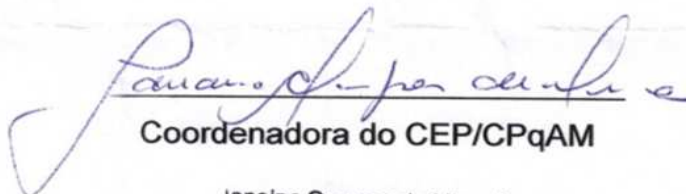
Registro no CAAE: 11083812.7.0000.5190

PARECER Nº 11/2013

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 06 de março de 2016. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 04 de abril de 2013.


Coordenadora do CEP/CPqAM

Janaina Campos de Miranda
Pesquisadora em Saúde Pública
Coordenadora
Mat. SIAPE 464777
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 06/03/2014.