

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Mestrado em Inovação Terapêutica

ANDRESA PEREIRA DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO
DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Recife, 2011

ANDRESA PEREIRA DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO
DA 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.**

Orientadora: Prof^a. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

Recife, 2011

Oliveira, Andresa Pereira de

Aplicação da citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana / Andresa Pereira de Oliveira. – Recife: O Autor, 2011.

97 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Valéria Rêgo Alves Pereira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Inovação Teurapêutica, 2011.

Inclui bibliografia e anexos

1. Leishmaniose 2. Diagnóstico I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Andresa Pereira de

Título: Aplicação da citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 10/02/2011

Banca Examinadora

Prof.^a. Dr.^a. Valéria Rêgo Alves Pereira

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Assinatura: Valéria Rêgo Alves Pereira

Prof.^a. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof.^a. Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Assinatura: Eduardo Henrique Gomes Rodrigues

Prof.^a. Dr. Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Assinatura: Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Prof.^a. Dr. Juliana Kelle Andrade Lemoine Neves

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Assinatura: _____

*Aos meus pais,
Josilene e Erivaldo,
por sempre acreditarem em mim
E ao meu marido,
Adim Mendes,
por me incentivar em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças e motivar em todos os momentos da minha vida.

A minha avó, Maria José, por toda credibilidade e confiança depositada em mim.

Aos meus pais, irmãos e sobrinho pelo amor, confiança e incentivo.

Ao meu marido, Adim Mendes, com muito amor, pelo companheirismo e compreensão constantes.

A minha orientadora, Dr^a Valéria Pereira, com carinho, pela amizade, confiança, oportunidade e excelente orientação.

A toda equipe do laboratório de Imunogenética, pelo convívio e ajuda na realização deste trabalho.

A Amanda, Carol e Fabiana por todas situações que passamos juntas, pela acolhida nas horas de desespero e pelos bons momentos juntas. Durante esses dois anos tive a certeza que vocês foram anjos enviados para auxiliar nos desafios da minha vida.

A Marina, Lucas e Cristiane pelos ensinamentos e amizade conquistada e, a Kaly principalmente pela sinceridade, pelas palavras de apoio e incentivo.

A Luiza (vida boa!), pela ajuda na concretização do trabalho e pela amizade.

A todos do departamento de Imunologia, em especial Éricka, Inês, Waléria e Isabele, pelo apoio desde sempre, vocês são amigos muito queridos.

A Maria Edileuza, pela disponibilidade, ensinamentos e amizade.

Aos amigos de mestrado, em especial Helena e Renato pela amizade, convivência e companhia durante esses dois anos. Foi maravilhoso ter vocês por perto!

Aos amigos de graduação, Clarissa, Luanna, Ronaldo, Amanda e Helena com enorme carinho. É muito bom poder contar com vocês!

A Facepe pela bolsa de estudo.

A coordenação da Pós-Graduação em Inovação Terapêutica.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.
Obrigada!

RESUMO

OLIVEIRA, AP. Aplicação da citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. 2011. 97f. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

A LTA é uma infecção parasitária tendo *Leishmania (Viannia) braziliensis* como agente etiológico de maior incidência no Brasil. Em todas as formas clínicas da doença, sabe-se que a resposta imune é dependente de células T. Embora estudos avaliem a resposta humoral na LTA, ainda não está esclarecido o papel de anticorpos específicos na imunidade contra *Leishmania*. Além disso, o diagnóstico da LTA demonstra dificuldades pois o mesmo é realizado por associações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais. Considerando os benefícios da citometria de fluxo, uma nova abordagem utilizada na pesquisa de anticorpos com aplicabilidade superior aos diferentes protocolos de detecção e revelação convencionais, este estudo trouxe uma alternativa através da pesquisa de anticorpos IgG de *L(V)braziliensis*, aplicável ao diagnóstico da LTA e critério de cura. O objetivo deste estudo foi comparar as técnicas de reação de imunofluorescência indireta (IFI) e citometria de fluxo na avaliação clínica-laboratorial dos pacientes antes e após cura clínica e avaliar a aplicabilidade da citometria de fluxo no monitoramento pós-terapêutico dos pacientes. Soros de 14 pacientes antes do tratamento (AT), 13 pacientes 1 ano após tratamento (PT), 10 pacientes 2 e 5 anos PT foram analisados e os resultados foram expressos em níveis de reatividade de IgG, a partir da porcentagem de parasitos fluorescentes positivos (PPFP). A diluição 1:256 das amostras permitiu diferenciar os indivíduos AT e PT. A análise comparativa da IFI e da citometria de fluxo pela curva ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) demonstrou, respectivamente, ASC (área sob a curva) = 0,78 (IC_{95%} = 0,64-0,89) e ASC = 0,90 (IC_{95%} = 0,75-0,95), demonstrando elevada acurácia do teste de citometria de fluxo. Nossos dados demonstram que 20% foi o melhor ponto de corte identificado pela curva ROC para o ensaio de citometria de fluxo. Este ensaio apresentou sensibilidade de 86% e especificidade de 77%, enquanto a IFI apresentou sensibilidade de 71% e especificidade de 69%. O monitoramento pós terapêutico através da análise comparativa dos índices de desempenho das técnicas em 1, 2 e 5 anos PT, revelou melhor desempenho da citometria de fluxo em relação a IFI. Portanto, a citometria de fluxo demonstrou ser uma alternativa diagnóstica aplicada ao estudo da LTA e que as informações obtidas nesse estudo abrem perspectivas para o monitoramento de cura pós- terapêutica da LTA.

Palavras-chave: LTA, IgG, citometria de fluxo, IFI.

ABSTRACT

OLIVEIRA, AP. Flow cytometry application on the diagnosis of the American tegumentary leishmaniasis. 2011. 97f. Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

ATL is a parasitic infection which has *Leishmania (Viannia) braziliensis* as the etiologic agent of highest incidence in Brazil. In all forms of the disease, it is known that the immune response is dependent on T cells. Although studies assessing the humoral immune response in ATL is not yet clarified the role of antibodies in immunity against *Leishmania*. Moreover, the diagnosis of ATL presents difficulties since it is done by associations with clinical, epidemiological and laboratory. Considering the applicability of flow cytometry, a new approach used in the detection of antibodies with superior applicability to different protocols of conventional detection and revelation, this study has brought an alternative of IgG antibodies to *L (V) braziliensis*, applicable to the ATL diagnosis and cure criterion. The aim of this study was to compare the techniques of indirect immunofluorescence assay (IFA) and flow cytometry to clinical and laboratory evaluation of patients before and after clinical cure and evaluate the use of flow cytometry in post-therapeutic monitoring of patients. Sera from 14 patients before treatment (BT), 13 patients 1 year after treatment (AT), 10 patients 2 and 5 years AT were analyzed and the results were expressed as levels of IgG reactivity, based on the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP). The 1:256 samples dilutions allowed differ individuals BT and AT. Comparative analysis of IFA and flow cytometry by ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) showed, respectively, AUC (area under curve) = 0.78 (95% CI = 0.64-0.89) and AUC = 0.90 (95% CI = 0.75-0.95), demonstrating that the flow cytometry has a higher accuracy. Our data demonstrated that 20% was the best cut off point identified by the ROC curve for the flow cytometry assay. This test showed a sensitivity of 86% and specificity of 77% while the IFA had a sensitivity of 71% and specificity of 69%. After treatment monitoring through performance indexes comparative analysis of the techniques 1, 2 and 5 years AT, showed a better performance flow cytometry in relation to IFI. Therefore, flow cytometry showed to be a better alternative diagnostic when applied to the study of ATL and the information obtained in this work opens perspectives to monitor cure after treatment of ATL.

Keywords: ATL, IgG, flow cytometry, IFA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição da leishmaniose tegumentar no velho e no novo mundo.	04
Figura 2	Inseto vetor da leishmaniose, flebotomíneo. <i>Lutzomyia</i> SP.	08
Figura 3	Caracterização das diferentes formas clínicas da LTA. (A) Forma cutânea; (B) Forma mucosa; (C) Forma difusa; (D) Forma disseminada.	16
Figura 4	Organograma com diagnóstico da LTA.	17
Figura 5	Seleção da população de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> (V.) <i>braziliensis</i> , utilizando-se os parâmetros de tamanho e granulosidade (A). Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) obtidos com controle interno da reação (B), após a incubação com um soro de um indivíduo não infectado (C) e um soro de um paciente portador de LTA (D).	30
Figura 6	Fotos representativas da cicatrização das lesões dos pacientes.	35
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 tracejada corresponde ao ponto de corte de 1:20.	33
Figura 8	Curvas de titulação de anticorpos IgG anti-formas promastigotas de <i>L.(V.) braziliensis</i> presentes em soros dos pacientes classificados quanto a presença de lesão (AT) e a ausência de lesão (1, 2 e 5 anos PT). A linha pontilhada corresponde ao ponto de corte de 20% de PPFP.	40
Figura 9	Avaliação da aplicabilidade do ensaio de citometria de fluxo na identificação de pacientes com LTA ativa, a partir dos soros de pacientes da região de reatividade com título diferencial entre AT e 1, 2 e 5 anos PT. A linha pontilhada corresponde ao ponto de corte de 20% de PPFP.	41
Figura 10	Comparação entre as curvas ROC de IFI e citometria de fluxo, construídas a partir do desempenho, sensibilidade e 100-especificidade dos testes avaliados. 0,9 e 0,8 correspondem as ASC= área sob a curva da citometria de fluxo e IFI, respectivamente.	43
Figura 11	Curvas de sensibilidade e especificidade da citometria de fluxo obtidas a partir de diferentes pontos de corte expressos em PPFP.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Casos de leishmaniose tegumentar americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009.	06
Tabela 2	Esquema terapêutico para leishmaniose tegumentar americana.	11
Tabela 3	Componentes dos meios de cultura para isolamento de LTA	19
Tabela 4	Categorias para os resultados do teste diagnóstico dos pacientes.	31
Tabela 5	Características dos pacientes em relação ao sexo, faixa etária, localidade de origem, forma clínica, número de lesões, local das lesões, tamanho das lesões, tempo de evolução da doença e número de ampolas.	34
Tabela 6	Resultados laboratoriais dos pacientes suspeitos de LTA, atendidos pelo serviço de referência em leishmanioses do CPqAM/FIOCRUZ.	36
Tabela 7	Resultados do teste de imunofluorescência indireta dos pacientes antes e após o tratamento com Glucantime.	37
Tabela 8	Tabela para cálculo de sensibilidade e especificidade para o teste de imunofluorescência indireta (IFI) dos pacientes 1,2 e 5 anos após o tratamento da leishmaniose tegumentar americana.	39
Tabela 9	Tabela para cálculo de sensibilidade e especificidade para o teste de citometria de fluxo dos pacientes 1,2 e 5 anos após o tratamento da leishmaniose tegumentar americana.	42

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LVA	Leishmaniose visceral americana
OMS	Organização mundial de saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)
IFI	Imunofluorescência indireta
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Ig	Imunoglobulina
LM	Leishmaniose mucocutânea
LC	Leishmaniose cutânea
LD	Leishmaniose difusa
IL	Interleucina
TGF	Fator de crescimento tumoral (Tumor growth factor)
IFN	Interferon
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein isothiocyanate)
SFB	Soro fetal bovino
PBS	Solução tampão fosfato (Phosphate buffer solution)
FSC	Detector de Dispersão Frontal (Forward Scatter)
SSC	Detector de Dispersão Lateral (Side Scatter)
PPFP	Porcentagem de parasitos fluorescentes positivos
ROC	Característica Operativa do Receptor (Receiver Operating Characteristic)
ASC	Área sob a curva
NNN	Meio de cultura Novy MCNeal Nicole
AT	Antes do tratamento
PT	Após o tratamento
<i>L.</i>	<i>Lutzomyia</i>
CPqAM/FIOCRUZ	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
Sb ⁺⁵	Antimonial pentavalente
B	Beta
Γ	Gama
μL	Microlitros
μm	Micrômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	04
2.2 Agente etiológico e vetores.....	07
2.3 Tratamento da leishmaniose tegumentar americana.....	09
2.4 Critério de cura da leishmaniose tegumentar americana.....	11
2.5 Resposta imune na leishmaniose tegumentar americana.....	12
2.5.1- Imunidade celular.....	12
2.5.2 Imunidade humoral.....	13
2.6 Aspectos e diagnóstico clínicos da leishmaniose tegumentar americana.....	15
2.7 Diagnóstico laboratorial da leishmaniose tegumentar americana.....	17
2.7.1 Diagnóstico parasitológico.....	18
2.7.2 Diagnóstico molecular.....	19
2.7.3 Diagnóstico imunológico.....	20
3 JUSTIFICATIVA.....	23
4 OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivo Geral.....	24
4.1 Objetivos Específicos.....	24
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1 Tipo de estudo.....	25
5.2 População de estudo.....	25
5.2.1 Considerações éticas.....	25
5.3 Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes.....	26
5.4 Obtenção das formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	26
5.5 Obtenção de soro	27
5.6 Reação de imunofluorescência indireta.....	27

5.7 Citometria de fluxo.....	28
5.7.1 Análise dos dados.....	28
5.8 Análise estatística.....	31
5.8.1 Definição do ponto de corte.....	32
5.8.2 Curva ROC – <i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>	32
5.8.3 Intervalo de Confiança.....	32
 6 RESULTADOS PARCIAIS.....	 33
6.1 Caracterização da população de estudo.....	33
6.2 Diagnóstico laboratorial.....	36
6.3 Imunofluorescência indireta.....	37
6.4 Citometria de fluxo.....	39
6.5 Estudo das Curvas ROC.....	42
 7 DISCUSSÃO.....	 45
 8 CONCLUSÕES.....	 55
 9 PERSPECTIVAS.....	 56
 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 57
 11 ANEXOS.....	 74
ANEXO 1 - TCLE.....	74
ANEXO 2 - TCLE.....	75
ANEXO 3 – TCLE.....	76
ANEXO 4 – ARTIGO SUBMETIDO.....	77

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são infecções causadas por várias espécies de protozoários unicelulares pertencentes à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania* durante o repasto sanguíneo (MARZOCHI, 1992). São transmitidas ao homem e outros vertebrados pela picada de fêmeas infectadas de diversas espécies de flebotomíneos, que são vetores pertencentes à ordem Diptera, a família Psychodidae e aos gêneros *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (HEPBURN, 2000; GONTIJO; CARVALHO, 2003; BASANO; CAMARGO, 2004; PERINOTO et al., 2010). Durante seu ciclo evolutivo esses protozoários são caracterizados por apresentarem duas formas evolutivas: uma forma promastigota ou flagelada infectante, encontrada na luz do tubo digestivo dos insetos vetores, bem como em meio de cultura; e outra amastigota, aflagelada, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário (MARZOCHI, 1992; LAINSON; SHAW, 1992). As leishmanioses nas Américas apresentam formas clínicas distintas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, virulência e tropismo, além de condições genéticas e da resposta imune do hospedeiro; sendo representadas sob duas formas: a leishmaniose visceral americana (LVA) e a leishmaniose tegumentar americana (LTA) (LAINSON; SHAW, 1998; ROGERS et al., 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção por leishmanioses em mais de 88 países, distribuídos em quatro continentes (Europa, Ásia, África e América), com prevalência global em 12 milhões de pessoas. Destes, o número estimado anualmente para LTA, é de 1-1,5 milhões de novos casos (DESJEUX, 2004; AMEEN, 2010). Com uma expansão geográfica acentuada, em 2003, a LTA tornou-se autóctone em todos os Estados brasileiros, com uma incidência anual de 40.000 casos (MS, 2007; DESJEUX, 2004), o que caracteriza um sério problema de saúde pública.

Das seis espécies de *Leishmania* envolvidas na transmissão da LTA no Brasil, a *Leishmania (Viannia) braziliensis* tem ampla distribuição pelo território brasileiro. Essa espécie é o mais importante agente etiológico de LTA no Nordeste do Brasil e a única espécie circulante em Pernambuco, até 2008 (BRITO et al., 2008). Estudos em áreas

endêmicas de Pernambuco, através de inquéritos epidemiológicos de infecções e manifestações clínicas confirmaram um elevado risco de infecção (BRANDÃO-FILHO et al., 2003) onde foram notificados cerca de 12.000 novos casos de LTA nas duas últimas décadas. A LTA incide em todas as regiões do Estado de Pernambuco, principalmente na Zona da Mata que concentra cerca de 60% dos casos registrados (BRANDÃO-FILHO et al., 1999, BRITO et al., 2008).

Além dos desafios sócio-econômicos que agravam ainda mais o problema da LTA, o diagnóstico da doença demonstra dificuldades. Além disso, o diagnóstico da LTA demonstra dificuldades, pois o mesmo é realizado por associações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais (BRITO et al., 2000; 2008; KAR, 1995), sendo freqüentemente necessária a associação de vários elementos para se chegar ao diagnóstico definitivo (TAVARES et al., 2003).

O diagnóstico clínico nem sempre é simples ou imediato, pois a LTA muitas vezes é associada a outras enfermidades, pelo fato de suas manifestações clínicas se assemelharem a lesões ulceradas ou não de outras doenças, como cromomicose, esporotricose, alguns tipos de carcinoma, paracoccidioidomicose, sífilis, tuberculose cutânea e hanseníase virchowiana (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARZOCHI 1992). Além disso, existem as limitações dos métodos de diagnósticos convencionais. Um dos testes diagnósticos mais comuns é a identificação direta de amastigotas ao microscópio óptico, como método parasitológico. Como todas as espécies de *Leishmania* são morfológicamente idênticas, essa técnica não é capaz de determinar a espécie do parasito (BENSOUSSAN et al., 2006; VEGA-LÓPEZ, 2003).

A Intradermorreação de Montenegro (IDRM) é um teste bastante utilizado em inquéritos epidemiológicos de áreas endêmicas, apresentando-se positivo na maioria dos casos de LTA. Contudo, pode ser negativo nos casos em que as lesões são recentes entre seis semanas ou menos, assim como nos casos de leishmaniose cutânea difusa (MARZOCHI et al., 1980; SHAW; LAINSON, 1975). Outra metodologia empregada é a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* - PCR). Como método molecular demonstra alta sensibilidade (RODRIGUES et al., 2002). Embora demonstre alta sensibilidade e especificidade, sua aplicação é inviável para estudo populacional em virtude do alto custo (BRITO et al., 2000).

Testes sorológicos convencionais mais amplamente utilizados no diagnóstico laboratorial da LTA são a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio

imunoenzimático (*enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA). Entretanto, esses métodos apresentam limitações, pois não correlacionam os níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença e podem apresentar reações cruzadas com outros tripanosomatídeos (KAR, 1995; VEXENAT et al., 1996). Um dos grandes desafios enfrentados pelos pesquisadores tem sido a escolha da preparação antigênica ideal para análise sorológica, tanto no que se refere ao estudo dos mecanismos moduladores/indutores de doença, bem como para o diagnóstico, prognóstico e critérios de monitoração da infecção. Pelas limitações dessas técnicas, abordagens imunológicas alternativas vêm sendo empregadas. Uma delas é a citometria de fluxo, tecnologia que mede e analisa simultaneamente diversas características físicas de partículas individuais, à medida que o fluxo do fluido passa por um feixe de luz, permitindo com isso a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (ROCHA et al., 2002; 2006).

Contudo, um estudo da reatividade de imunoglobulinas séricas anti-formas tripomastigotas vivas e fixadas do *Trypanosoma cruzi*, permitiu avaliar no contexto *ex vivo* a reatividade de anticorpos dirigidos contra antígenos de membrana do parasito. Dessa forma, a reatividade dos soros com estruturas intracitoplasmáticas, alvos da reatividade cruzada com outros tripanosomatídeos, foi evitada (MARTINS-FILHO et al., 1995). Sendo assim, este estudo objetivou contribuir para uma melhor compreensão da resposta imune humoral relacionada à evolução clínica de pacientes com LTA em Pernambuco, bem como fornecer subsídios para o uso da técnica de citometria de fluxo como método eficaz de diagnóstico e com aplicabilidade no monitoramento de cura pós-terapêutica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia da Leishmaniose tegumentar americana

Atualmente, a LTA ocorre de forma endêmica em 82 países; tendo de um a 1,5 milhões de novos casos notificados por ano (Figura 1). Cerca de 90% dos casos ocorrem no Marrocos, Etiópia, Tunísia, Afeganistão, Paquistão, Irã, Iraque, Arábia Saudita, Síria, Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela. Nas Américas, a LTA ocorre desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, a exceção do Uruguai e do Chile (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010; WHO, 2010). Por ser uma das seis principais doenças de maior importância para a Organização Mundial de Saúde, a LTA caracteriza-se como problema de saúde pública (GAZOZAI et al., 2010).

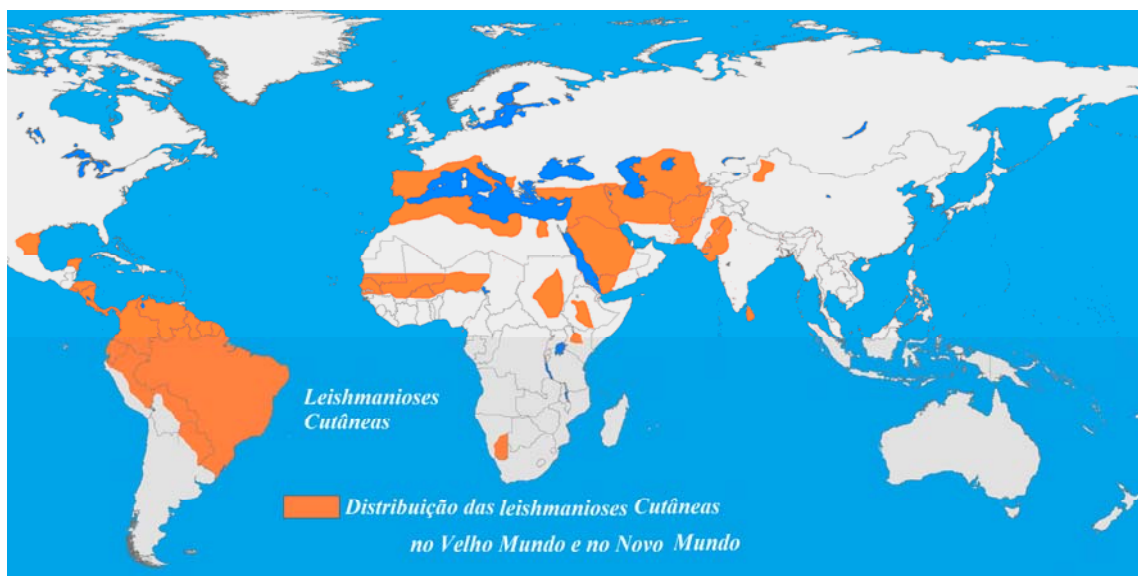


Figura 1: Distribuição da leishmaniose tegumentar no velho e no novo mundo. Fonte: Da autora (2008).

No Brasil, de 1988 a 2009, a LTA apresentou média anual de 26.021 casos registrados e coeficiente de detecção médio de 14,1 casos por 100.000 habitantes. Ao longo desse período, observou-se uma tendência no crescimento da endemia, registrando os coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram

níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (Tabela 1). Na década de 80 foram registrados casos em 20 Estados, e a partir de 2001 todas as unidades federativas foram notificadas com casos da doença. Com uma expansão geográfica acentuada, em 2003, a LTA tornou-se autóctone em todos os Estados brasileiros (MS, 2007). Além do aumento expressivo do número de casos, a LTA também é caracterizada por apresentar uma importante difusão espacial. Neste contexto, a LTA apresenta importante heterogeneidade, relacionada as diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas em sua etiologia, as formas clínicas associadas e o padrão de transmissão envolvido (BRANDÃO-FILHO, 1999; LAINSON; SHAW, 1998).

A LTA apresenta sua incidência acentuada em Pernambuco, por todas as regiões do Estado, principalmente na Zona da Mata que concentra cerca de 60% dos casos registrados (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; BRITO et al., 2008). É importante também registrar o aumento da ocorrência da LTA no Sertão do Estado (ANDRADE et al., 2009). Amostras isoladas de pacientes desta região apresentaram perfis isoenzimáticos de variantes para a principal espécie circulante *L. (V.) braziliensis* (BRITO et al., 1993; MARTINS et al., 2010). Para demonstrar o aumento e a força da infecção nesta região, foram realizados inquéritos epidemiológicos, caracterizando a distribuição da infecção e da doença na população (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; 2003).

Em Pernambuco foram notificados cerca de 12.000 novos casos de LTA nas duas últimas décadas. No Estado, a LTA ocorre em ambos os sexos e todas as faixas etárias. Um estudo realizado no município de Amaraji, na Zona da Mata de Pernambuco demonstrou através de um inquérito populacional, que a doença acomete tanto adultos do sexo masculino, como do sexo feminino e crianças, e em alguns casos atingindo todos os indivíduos de uma mesma família, indicando que a transmissão nesta região ocorre, freqüentemente, no ambiente peridomiciliar. O aumento da incidência e a persistência da transmissão neste Estado têm revelado um importante problema de saúde pública devido a expansão espacial (BRITO et al., 2008; BRANDÃO-FILHO et al., 1999; FNS, 2000).

Tabela 1: Coeficiente de detecção de casos de leishmaniose tegumentar americana por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1999 a 2009.

Região e UF	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Região Norte	75,0	83,0	93,9	91,6	103,7	117,6	88,5	97,9	51,2	82,3	89,8	61,2	75,6	98,0	93,3	72,7	58,8	64,5	57,3	53,9
Rorônia	124,1	186,0	186,4	227,3	174,2	186,6	141,2	119,0	103,2	134,4	107,8	111,0	126,6	136,0	147,4	108,7	77,1	61,1	63,0	68,8
Acre	14,4	60,2	94,1	128,7	83,3	80,2	101,3	85,4	54,5	93,1	166,6	124,8	183,3	230,6	249,4	202,5	163,7	129,8	142,9	131,1
Amazonas	84,4	122,8	158,2	89,4	32,7	67,1	41,4	95,8	28,4	80,8	66,0	74,2	71,9	125,9	71,4	60,5	46,9	65,5	53,2	42,4
Roraima	82,1	231,7	213,8	250,9	186,7	95,7	122,6	124,8	93,6	85,1	128,9	134,6	130,0	84,8	43,5	71,6	70,7	81,9	84,8	104,8
Pará	67,6	64,4	43,9	48,8	107,8	129,7	91,5	91,4	37,7	86,2	92,7	39,8	58,0	73,9	79,5	62,3	50,0	59,4	49,5	45,0
Amapá	65,9	135,7	158,5	208,2	281,8	197,7	148,4	237,7	212,0	201,8	129,0	10,4	73,0	103,8	210,1	97,5	96,6	104,8	102,6	81,9
Tocantins	62,0	32,9	49,7	59,9	83,9	73,1	82,3	61,2	40,9	72,3	48,4	54,6	51,4	49,3	44,2	37,8	38,8	35,0	30,2	45,7
Região Nordeste	29,7	28,2	16,5	18,8	32,5	30,9	25,3	26,2	18,5	19,0	28,0	23,1	19,2	16,2	15,8	15,9	12,0	11,4	11,3	12,9
Maranhão	64,0	79,5	40,4	56,4	121,3	90,3	72,7	88,7	44,0	55,7	81,9	98,7	75,2	64,3	51,7	55,6	35,2	37,3	26,3	25,5
Piauí	9,8	12,5	6,1	2,7	2,1	1,5	3,6	3,8	3,5	3,8	3,5	5,7	5,2	4,3	4,0	8,5	5,0	3,5	2,3	3,3
Ceará	61,2	44,9	21,0	22,3	29,1	63,5	41,0	40,9	21,2	17,8	42,3	33,7	27,7	17,1	26,3	24,4	12,2	11,2	8,3	11,6
Rio Grande do Norte	0,8	0,3	0,0	0,5	0,2	0,6	1,6	1,9	1,0	0,5	0,4	0,3	0,2	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2	1,8
Paraíba	2,7	5,2	10,6	8,3	8,0	5,9	5,2	7,0	3,4	1,2	5,2	1,4	1,9	1,6	2,1	1,9	1,3	1,6	1,4	2,9
Pernambuco	9,6	6,6	5,2	6,0	10,9	12,0	9,7	9,0	8,5	11,8	15,0	6,5	6,9	6,8	8,7	4,0	4,9	5,2	4,4	5,7
Alagoas	1,1	2,1	2,1	2,7	8,5	4,2	3,1	5,5	2,7	5,8	9,4	3,1	2,8	3,3	2,2	1,9	1,1	3,6	2,8	2,4
Sergipe	3,7	3,3	1,6	3,0	2,9	3,2	1,2	2,9	2,0	1,8	3,3	5,1	3,3	0,9	0,4	0,6	0,3	0,2	0,5	0,5
Bahia	37,3	35,0	23,1	24,2	38,8	28,4	28,6	25,2	28,2	25,7	29,9	15,3	14,7	15,0	12,8	14,5	16,7	13,6	20,8	23,5
Região Sudeste	3,8	5,4	6,1	7,4	5,8	3,9	3,5	3,4	4,3	4,8	4,2	2,9	3,9	4,3	3,3	3,6	3,6	2,4	2,0	2,0
Minas Gerais	8,6	13,5	15,7	15,8	12,5	9,5	9,0	8,5	11,5	12,1	10,7	6,2	8,8	9,5	8,0	9,4	9,5	6,7	5,7	5,1
Espírito Santo	26,2	27,9	27,2	33,1	17,9	11,0	8,7	14,2	22,3	30,1	18,4	11,1	6,5	7,2	4,4	5,7	7,0	3,1	2,2	2,9
Rio de Janeiro	1,8	2,5	2,1	3,8	3,0	1,8	2,1	2,3	1,4	2,0	1,8	1,2	2,0	1,5	1,4	2,1	1,8	0,8	0,3	0,6
São Paulo	0,4	0,7	1,1	2,6	2,5	1,4	1,0	0,4	0,4	0,4	0,7	1,3	2,1	2,6	1,7	1,2	1,2	0,8	0,8	0,9
Região Sul	0,8	0,6	3,1	3,6	5,9	3,4	2,6	1,8	1,8	1,9	3,4	2,2	3,7	3,6	2,3	2,0	2,1	1,9	2,3	1,7
Paraná	2,3	1,6	8,1	9,5	15,7	9,1	6,8	4,8	5,0	4,9	9,0	5,7	9,3	8,9	5,8	4,3	3,9	4,2	5,0	3,8
Santa Catarina	-	-	-	-	-	-	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,3	0,5	0,3	1,4	2,7	1,1	1,4	0,7
Rio Grande do Sul	-	-	-	-	-	0,0	-	-	-	-	0,0	0,0	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Região Centro-Oeste	26,7	37,7	33,8	39,6	42,3	52,0	45,1	44,2	27,1	50,5	40,2	38,9	40,0	40,4	35,6	33,7	29,0	22,9	21,9	32,3
Mato Grosso do Sul	12,6	9,3	16,7	11,6	12,9	29,7	9,2	22,5	12,8	11,1	7,7	17,6	14,1	10,8	8,7	6,1	5,0	4,2	5,1	4,4
Mato Grosso	103,1	158,2	127,2	153,6	168,2	194,2	187,6	169,0	97,9	206,1	162,1	149,0	156,1	158,0	139,1	128,8	111,3	93,3	85,2	129,9
Goiás	5,7	4,5	6,8	8,3	6,4	6,5	7,7	9,2	9,3	11,0	10,6	8,0	8,5	9,4	8,5	10,3	8,8	4,2	6,0	7,8
Distrito Federal	0,0	-	0,1	0,1	-	0,1	-	0,8	0,1	0,5	0,0	1,4	1,4	2,6	2,6	1,4	2,1	1,4	0,6	1,0
Brasil	17,4	19,4	16,5	18,1	22,8	22,9	19,0	19,8	13,5	19,8	20,3	15,5	16,2	17,4	16,0	14,5	12,0	11,3	10,5	11,4

Fonte: GranVIGIM - atualizado em 18/08/10

2.2 Agente etiológico e vetores

O parasito da LTA apresenta DNA extra nuclear, cinetoplasto e uma organela mitocondrial. Apresenta-se na forma flagelada promastigota, encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e, amastigota, encontrada no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro mamífero (DEDET et al., 1999, GRIMALDI, 1982; GOTO; LINDOSO, 2010). Cerca de 20 espécies do gênero *Leishmania* são conhecidas por acometer o homem e alguns pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos (GAZOZAI et al., 2010). Esses últimos constituem a fonte de infecção para os insetos vetores das leishmanioses, os flebotomíneos. Estes insetos pertencem a ordem Díptera, família Psychodidae e gênero *Lutzomyia* (Figura 2).

Aproximadamente 30 espécies de *Lutzomyia* têm a sua capacidade de transmissão da *Leishmania* sp. comprovada nas Américas (LAINSON; SHAW, 1998; JACOBSON, 2010). Os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Espírito Santo e Minas Gerais têm como principal vetor incriminado o *Lutzomyia intermedia*. Já na Amazônia, o vetor incriminado é o *Lutzomyia wellcomei* (LAINSON; SHAW, 1979).

Na Região Nordeste, a LTA apresenta algumas peculiaridades entre seus Estados, embora também com alguma similaridade intra-regional. Na Região de Três Braços, Bahia, região cacauieira com resquícios de Mata Atlântica, *Lutzomyia whitmani* é o vetor incriminado (VEXENAT et al., 1986; FRANÇA et al., 1991; JONES et al., 1987; MARSDEN, 1994; GALATI et al., 1996). No Ceará, os estudos realizados na região de Baturité apresentaram resultados heterogêneos. O vetor possivelmente envolvido na transmissão silvestre é o *Lutzomyia wellcomei* (READY; RIBEIRO, 1983), enquanto que *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia migonei* estariam associados à transmissão peridomicilar (AZEVEDO et al., 1990a; 1990b; DE QUEIROZ et al., 1994).

Em Pernambuco, com predominância importante e infecção natural confirmada, *L. whitmani* apresentou evidências que o apontam como a principal espécie envolvida no ciclo de transmissão peridomiciliar nesta área (ANDRADE, 2004; CAMPBELL-LENDRUM et al., 1999). A distribuição da infecção e da doença na população foram bem caracterizadas na Zona da Mata de Pernambuco, em inquéritos epidemiológicos realizados entre 1991 e 1996. A única espécie circulante encontrada foi a *Leishmania*

(V.) *braziliensis*, demonstrando o aumento e a força da infecção na região (BRANDÃO-FILHO et al., 1999). Embora a LTA em Pernambuco, ocorra principalmente na Zona da Mata, observa-se nos últimos anos uma expansão geográfica no Estado.



Figura 2: Inseto vetor da leishmaniose, flebotomíneo. *Lutzomyia* SP.

Fonte: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/vetores.htm>.

Inicialmente, a classificação taxonômica do parasito no Novo Mundo levava-se em consideração aspectos epidemiológicos, manifestações clínicas e a distribuição geográfica da doença. Posteriormente, aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares também orientaram a classificação. O parasito da LTA está agrupado em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987; CASTILHO et al., 2003). No Brasil, das seis principais espécies de *Leishmania* envolvidas na etiologia da LTA, apenas a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pertence ao subgênero *Leishmania*, as outras cinco espécies estão representadas no subgênero *Viannia*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MS, 2007).

A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no Brasil se distribui em áreas de florestas primárias e secundárias tipo várzea e igapó (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e sudoeste do Maranhão), também na Bahia, em Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Paraná. No homem é responsável pela leishmaniose cutânea e cutâneo-difusa ou

anérgica, esta não responde aos diversos tipos de tratamento (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003; MS, 2007).

A *Leishmania (Viannia) guyanensis* está distribuída no Brasil ao norte do rio Amazonas (Acre, Amazonas, Pará, Amapá e Roraima), em florestas de terra firme, com áreas que não se alagam durante o período de chuvas. No homem é responsável por lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas, raramente com lesões nas mucosas. Na Amazônia, ocorre a *Leishmania (Viannia) naiffi*, distribuindo-se nos Estados do Pará e Amazonas e causando a leishmaniose cutânea no homem. E a *Leishmania (Viannia) lainsoni* ocorre até o momento nos Estados do Pará, Rondônia e Acre; responsável pela leishmaniose cutânea. Na região nordeste e sudeste do Estado do Pará e região oeste do Maranhão, distribui-se a *Leishmania (Viannia) shawi* (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003; MS, 2007).

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente etiológico da LTA por Gaspar Vianna em 1911, apresentando distribuição ampla por todo território brasileiro desde o norte até o sul (AGUIAR, 1962; GONTIJO; CARVALHO, 2003; MS, 2007). No homem, a doença é caracterizada por úlcera cutânea, única ou múltipla, cuja principal complicação é a metástase por via hematogênica, para as mucosas da nasofaringe, com destruição dos tecidos. Nos últimos tempos, a frequência desta complicação vem sendo reduzida, não excedendo a 5% dos casos nas áreas endêmicas. Provavelmente, esta redução está associada ao diagnóstico e tratamento precoces (MS, 2007).

2.3 Tratamento da leishmaniose tegumentar americana

As drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes, cujas doses padronizadas (Tabela 2), foram recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (HEPBUM 2001). Há dois tipos de antimoniais pentavalentes utilizados: o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam). O primeiro é distribuído pelo programa de controle de LTA do Ministério da Saúde do Brasil e é indicado como primeira escolha para o tratamento de todas as formas de LTA, exceto para pacientes coinfectados com HIV e gestantes; e o segundo, estibogluconato

de sódio, não é comercializado no Brasil (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MS, 2007; GOTO; LINDOSO, 2010).

O esquema terapêutico é composto por doses de 20 mg/Kg/dia através de injeções intramusculares ou endovenosa em ciclos de vinte a trinta dias (WHO, 2010). Sabe-se 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*, usados há mais de 50 anos, ainda não se sabe corretamente o mecanismo de ação destas drogas (REIS 2007).

As drogas de segunda escolha são: a Anfotericina B, um antibiótico poliênico com excelente atividade *in vitro* na destruição de *Leishmania* intra e extracelular; e o isotionato de pentamidina, que são diamidinas aromáticas usadas no tratamento de LTA em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano. A anfotericina B é administrada por via endovenosa, gota a gota, na dose diária ou em dias alternados de 1 mg/Kg/dia sem ultrapassar a dose de 50mg em cada aplicação e um total de 1- 1,5g no tratamento. É dissolvida em soro glicosado 5% com tempo de infusão de 3 a 4 horas. Apresenta inúmeros efeitos adversos por ser um medicamento altamente tóxico para as células do endotélio vascular. Durante a infusão lenta pode ocorrer cefaléia, febre, calafrios, astenia, dores musculares, vômitos e hipotensão; e durante a infusão rápida pode ocorrer alterações cardiovasculares e até parada cardíaca, às vezes. As complicações renais, em diferentes graus, ocorrem em praticamente todos os pacientes ao longo do tratamento (MS, 2007).

Já o isotionato de pentamidina é usada na dose de 4 mg/Kg/dia, por via intramuscular profunda, sendo aplicado a cada dois dias, não ultrapassando a dose total de 2g. Devido ao medicamento ter ação no metabolismo da glicose, pode haver hipoglicemia seguida de hiperglicemia, quando do seu uso. Sendo assim, tanto a Anfotericina B quanto o isotionato de pentamidina, ambas são drogas tóxicas e muitas vezes causam reações adversas graves, sendo empregadas quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial (MS, 2007; GOTO; LINDOSO, 2010).

Tabela 2: Esquema terapêutico para leishmaniose tegumentar americana.

DROGA	DOSE	DURAÇÃO	VIA	REAÇÕES
ANTINOMIAIS PENTAVALENTES	20mg Sb/kg/dia	20 a 30 dias	EV ou IM	alterações cardíacas, pancreáticas ou renais.
ISOTIONATO DE PENTAMIDINA	4 mg/Kg/dia	A cada 2 dias até completar a dose total de 2g	IM	hipoglicemia seguida de hiperglicemia
ANFOTERICINA B	1 mg/Kg/dia	Diária ou dias alternados até completar a dose total de 1- 1,5g	EV	cefaléia, febre, calafrios, astenia, dores musculares, vômitos, hipotensão, alterações cardiovasculares e complicações renais.

IM= intramuscular, EV= endovenosa.

2.4 Critério de cura da leishmaniose tegumentar americana

O critério de cura é baseado na cura clínica pela reepitelização completa das lesões ulceradas ou não, regressão total da infiltração e eritema, até três meses após o tratamento na forma cutânea. Na forma mucosa é definido pela regressão de todos os sinais e comprovado pelo exame otorrinolaringológico, até seis meses após o tratamento (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MAYRINK et al., 2006; MS, 2007; WHO, 2010).

Várias abordagens já foram sugeridas como critério de cura após o tratamento da LTA, como a utilização de testes parasitológicos (cultivo e isolamento do parasito). Entretanto, supondo que a resposta imune humoral possa desempenhar um papel modulador da resposta celular durante a infecção, Bitterncourt et al (1968), sugeriu a possibilidade da pesquisa de anticorpos no monitoramento de cura da LTA. O autor observou o estudo da reatividade de anticorpos anti-*Leishmania* através da sorologia convencional pela IFI e a sugeriu como critério de cura pós-terapêutica na LTA.

Na possibilidade de utilizar a IFI como critério de cura da LTA, estudos mostraram a diminuição dos níveis de anticorpos em pacientes após o tratamento com antimoniais. Em outros trabalhos os títulos de IgG foram negativos, sugerindo a existência de correlação entre cura clínica das lesões e a negatificação dos títulos da IFI (AMATO et al., 1998; SCHUBACH et al., 1998). Ainda assim, o uso da IFI como critério de cura trata-se ainda de um assunto controverso, uma vez que ocorre a demonstração da persistência de parasitos após cura, espontânea ou pós-terapêutica.

Mendonça et al.,(2004) observaram que em sete de 32 pacientes curados clinicamente ocorreu a positividade para *Leishmania* por IFI. Muitos 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. A demonstração da persistência de parasitos após a cura clínica da LTA levanta vários assuntos com um olhar para evolução clínica, epidemiológicas e controle da LTA (MENDONÇA et al., 2004)

A dinâmica da produção de anticorpos após o tratamento com antimonialis ainda não é bem conhecido e valores preditivos de baixos ou altos níveis de anticorpos contra antígenos específicos continuam indefinidos (ROMERO et al., 2005). O problema pode ser atribuído a falta de uma preparação antigênica padrão para ser usada na detecção de anticorpos específicos.

Rocha et al. (2002), considerando as aplicabilidades da citometria de fluxo, como uma nova abordagem para a pesquisa de anticorpos, com um sistema isento de variabilidades metodológicas inerentes ao analista e com aplicabilidade superior aos diferentes protocolos de detecção e revelação convencionais; trouxeram uma alternativa através da pesquisa de anticorpos IgG anti-formas promastigotas vivas de *Leishmania* (V.) *braziliensis*, aplicável ao diagnóstico e critério de cura pós-terapêutica da LTA.

2.5 Resposta imune na leishmaniose tegumentar americana

2.5.1 Imunidade celular

Embora altos títulos de anticorpos possam ser encontrados em todas as manifestações clínicas da LTA, o desenvolvimento da imunidade celular por parte do hospedeiro, tem atuação confirmada na proteção contra infecção por *Leishmania*. Sabe-se que ocorre uma expansão caracterizada por células T CD4+, apresentando perfis de citocinas Th1 ou Th2 (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; STENGER; RÖLLINGHOFF, 2001; REIS et al., 2006; HOLZMULLER et al., 2006).

Em estudos realizados em camundongos, *in vivo* e *in vitro*, a resposta imune mediada por células T na infecção por *L* (V.) *braziliensis* é pouco caracterizada. Isso ocorre devido à dificuldade de crescimento *in vitro* deste parasito, uma vez que sua

transformação na forma infectante é ineficiente em condições padronizadas de cultura e ocorre a resistência natural de muitas linhagens de camundongos frente à infecção, sendo necessária uma grande carga parasitária para realizar a infecção (LIMA et al, 1999; 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).

Em todas as formas clínicas da doença, a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, aceita-se que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção está associada ao nível de expansão de células Th1 e Th2. (BACELLAR et al., 2002). Além dos perfis Th1 e Th2, a resposta imune nas infecções por *Leishmania* tem sido cada vez mais aprofundada em termos de complexidade. Em alguns trabalhos, foi descrito o perfil Th3, induzido por TGF- β , que pode induzir e manter a tolerância periférica através de células T regulatórias (T_{reg}) (WEINER, 2001; CARRIER et al., 2007), além do perfil Th17, que pode estar envolvido em processos que levam à cronicidade da doença (BACELLAR et al., 2009).

2.5.2 Imunidade humoral

Geralmente se aceita que a resposta imune protetora na infecção por *Leishmania* seja essencialmente celular, relegando a participação dos anticorpos a segundo plano (LIEW; O'DONNELL, 1993). A associação entre o perfil da resposta imune humoral e a patogênese de um dado processo infeccioso tem sido feita em várias doenças, tais como hanseníase, AIDS, filariose e malária (KURNIAWAN et al. 1993, HUSSAIN et al. 1995, OUAAZ et al. 1996, PERLMANN et al. 1997). Entretanto, a contribuição da resposta imune humoral na LTA não está ainda bem estabelecida (O'NEIL et al. 1993, RODRIGUEZ et al. 1996).

Estudos voltados para a análise da resposta imune humoral na LTA têm 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 (O'NEIL et al., 1993; RODRIGUEZ et al., 1996; MOLESLEH et al., 1995; CHIARI et al., 1973).

Há um consenso geral que as células T e a imunidade mediada por células contribuem para a patogênese das diferentes formas de LTA. Embora estudos avaliem a resposta humoral na LTA, ainda não está completamente esclarecido o papel de anticorpos específicos na imunidade contra *Leishmania* (TRUJILLO et al., 1999; SOUZA et al., 2005). Sabe-se que ocorre influência do padrão de citocinas na ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B em células produtoras de imunoglobulinas (THOMAS; BUXBAUM, 2008). Em modelos murinos de infecções por *Leishmania* uma resposta Th2-IL-4-IgG1 tem sido associado com susceptibilidade a infecção e, uma resposta Th1-IFN- γ -IgG2a tem sido associado com imunidade protetora (AFRIN; ALI, 1997; 1998; ANAM et al., 1999).

Estudos sugerem que citocinas do tipo 1, produtores 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 et al., 1994). Citocinas do tipo 2 produtores de IL-4 e IL-5 induzem a produção de altos níveis de IgG3, IgG4, IgE e IgA em humanos (ULRICH et al., 1995; KITANI et al., 1993; GASCAN et al., 1991). Sabe-se que a produção de IgG3, IgG4 e IgE estão associadas a IL-4, e sua inibição estão associadas ao IFN- γ . Enquanto o aumento dos níveis de IgG1 e IgG3 estão associados ao IL-10 (BUXBAUM, 2008; SKEIKY et al., 1997). No entanto, os níveis de IgA dependem de TGF- β (STAVNEZER; KANG, 2009).

Nas leishmanioses cutânea (LC) e mucocutânea (LM), 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 (LD), com presença de IgG4 (SOUZA et al., 2005). Estudos direcionam a atenção para a correlação das subclasses de IgG com as manifestações clínicas da LTA. Assim, elevados níveis de anticorpos dos isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 e baixos níveis ou ausência de anticorpos do isotipo IgG4 podem ser detectados no soro de pacientes com LC. No soro de pacientes com LM tem-se altos níveis de IgG1, enquanto os níveis de IgG2, IgG3 e IgG4 são comparados aos encontrados no soro de pacientes com LC. Já nos pacientes com LD os níveis de IgG4 são bastante elevados, enquanto os níveis de IgG1 e IgG2 são semelhantes aos encontrados no soro de pacientes com LC e LM (RODRIGUEZ et al., 1996; REIS et al., 2006).

Estudos demonstram 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 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). A intensidade da resposta humoral parece estar 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., 1999; REIS, 2007).

Estudos com os métodos imunossorológicos disponíveis, para pesquisa de anticorpos na LTA, apresentam resultados controversos, devido a sua baixa sensibilidade e especificidade (RIBEIRO et al., 2007; BOURDOISEAU et al., 2009; MUKBEL et al., 2006). No entanto, estudos têm mostrado a vantagem do uso de anticorpos específicos no diagnóstico da leishmaniose visceral (OZBILGE et al., 2006; CHATTERJEE et al., 1998). Mohammadi et al., (2006) demonstrou que as subclasses IgG1 e IgG2 podem ser utilizadas como indicadores de acompanhamento da evolução da doença. Neste estudo os níveis de IgG1 se encontravam aumentados antes do tratamento, e pós-tratamento altos níveis de IgG2 eram observados.

2.6 Aspectos e diagnóstico clínicos da leishmaniose tegumentar americana

A infecção humana por LTA pode ser assintomática ou apresentar um espectro de formas clínicas que podem variar, desde lesões cutâneas localizadas, disseminadas, difusas ou nodulares até as graves lesões mucocutâneas (Figura 3) (GRIMALDI; TESH, 1993). As lesões cutâneas localizadas são caracterizadas pela formação única, as lesões cutâneas disseminadas são caracterizadas por numerosas lesões em várias regiões do corpo, as lesões cutâneas difusas caracterizam-se pelas formações nodulares, que são deformantes e muito graves, semelhantes as lesões manifestadas na hanseníase virchowiana (MS, 2007; GOTO; LINDOSO, 2010).

As lesões cutâneas podem ainda apresentar-se morfológicamente como: impetigóide, liquenóide, tuberculosa ou 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 et. al, 2005). Acomete a região nasofaríngea, laringe e cavidade oral, e é de natureza metastática

(MS, 2007). As lesões podem ser confundidas tanto com doenças infecciosas como paracoccidiodomicose, histoplasmose e sífilis; quanto doenças neoplásicas como carcinoma e linfoma (ÁVILA et. al, 2004).

O diagnóstico clínico da LTA pode ser feito com base nas características da lesão associadas à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância. São frequentes as ulcerações com bordas elevadas em moldura, fundo com tecido granuloso e indolores. A apresentação clínica exhibe polimorfismo e o espectro de gravidade dos sinais e sintomas é variável, o que torna o diagnóstico clínico difícil (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MS, 2007). Devido à dificuldade encontrada para o diagnóstico clínico seguro, os métodos laboratoriais fazem parte do arsenal de investigação.



Figura 3: Caracterização das diferentes formas clínicas da LTA. (A) Forma cutânea (lesão clássica em moldura); (B) Forma mucosa; (C) Forma difusa; (D) Forma disseminada.

Fonte: GONTIJO; CARVALHO, 2003.

2.7 Diagnóstico laboratorial da leishmaniose tegumentar americana

As diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas, as formas clínicas e o tempo de evolução das lesões levam à variabilidade das manifestações da infecção e direcionam o diagnóstico para os métodos laboratoriais. A associação das evidências clínicas, epidemiológicas e laboratoriais é necessária para se chegar ao diagnóstico final da LTA, pois ainda não se dispõe de um método que possa ser usado como padrão-ouro para detecção e diagnóstico de infecção por *Leishmania* (BRITO et al., 2000; REIS, 2007). Os exames laboratoriais podem ser divididos em técnicas de detecção do parasito, técnica molecular e técnicas de imunodiagnósticos (Figura 4) (SALMAN et al., 1999).

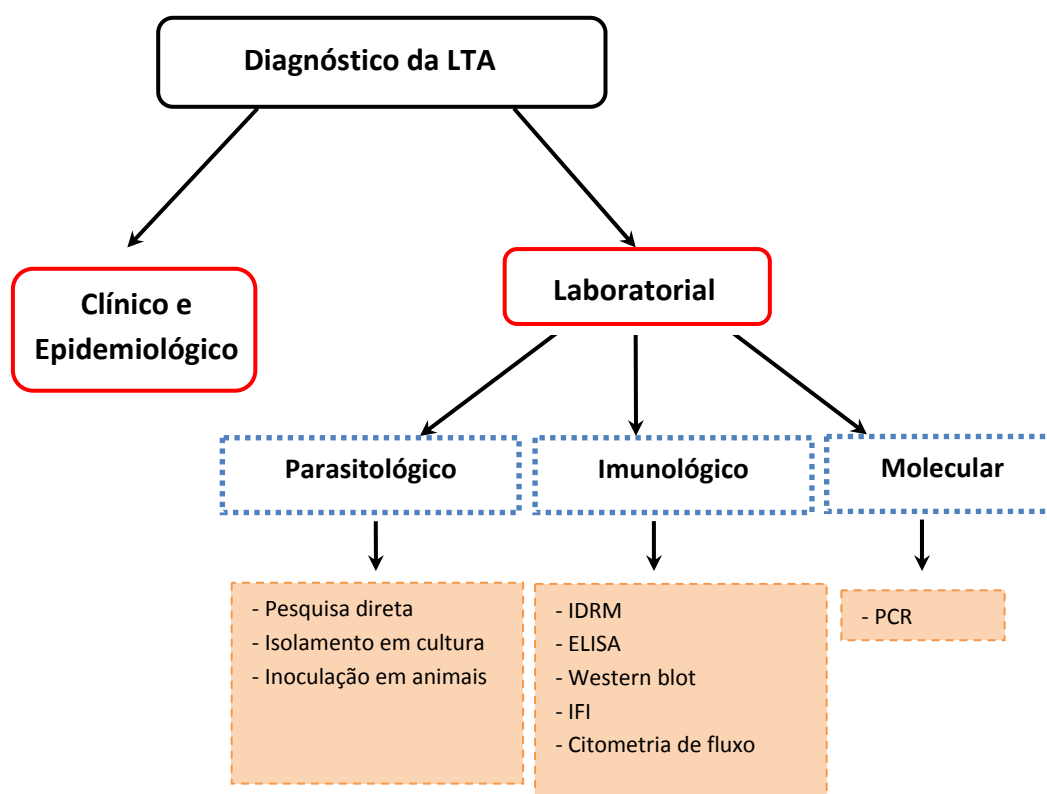


Figura 4: Organograma com diagnóstico da LTA. Fonte: Da autora.

2.7.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico de certeza de um processo infeccioso é feito pelo encontro do parasito, através da pesquisa direta, isolamento em cultura, inoculação em animais experimentais (MACHADO, 2004; MS, 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, 2000). Essa técnica tem sensibilidade de 50 a 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 baixo custo, não é capaz de detectar parasitos em todos os pacientes (BENSOUSSAN et al., 2006; VEGA-LÓPEZ, 2003).

O isolamento do parasito pode ser feito através da cultura em meios apropriados, como o meio bifásico Novy e McNeal modificado por Nicolle-NNN (Novy & Macneal 1903, Nicolle 1908), Liver Infusion Tryptose- LIT (Camargo 1964) e/ou Schneiders (Tabela 3) suplementado com soro fetal bovino inativado, a partir de material obtido por punção aspirativa ou biópsia das lesões dos pacientes. A sensibilidade do isolamento em cultura é variável, geralmente baixa, em torno de 20 a 40%. É difícil manter o parasito *in vitro* devido à freqüente contaminação dos meios de cultura com fungos e bactérias, além do longo período necessário para isolar o parasito na cultura. Além dos aspectos da técnica de isolamento, a baixa sensibilidade da cultura está relacionada à escassez do parasito nas lesões, principalmente *L. (V.) braziliensis* (RODRIGUEZ et al., 1994; LIMONCU et al., 1997; BRANDÃO-FILHO et al., 1999; BENSOUSSAN et al., 2006; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2006; REITHINGER et al., 2007).

Tabela 3: Componentes dos meios de cultura para isolamento de LTA

MEIO DE CULTURA	COMPONENTES	APLICAÇÃO
NOVY-McNeal-NICOLLE-NNN	Agar sangue base acrescido de Sangue de coelho	Cultivo de <i>Leishmania</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>
LIVER INFUSION TRYPTOSE- LIT	NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ , Tryptose, Infuso de fígado, Hemoglobina de sangue bovino	Isolamento de <i>Leishmania</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>
SCHNEIDERS INSECT MEDIUM	L-glutamina sem L-cystina, L-tirosina, Yeastolato, sódio e bicarbonato	Isolamento de <i>Leishmania</i>

A inoculação em animais susceptíveis para cultivo *in vivo*, sendo o hamster (*Mesocricetus auratus*) o animal mais usado, consiste em um método de grande importância para o isolamento e caracterização da espécie de *Leishmania* envolvida (WEIGLE et al., 1987). Porém, o longo período de acompanhamento até a formação da úlcera no animal e os elevados custos para manutenção dos animais limitam o método às instituições de pesquisa científica; tornando-o inadequado para rastreamentos epidemiológicos em grande escala e de pouco valor prático para a rotina laboratorial (RODRIGUES, 2000; BENSOUSSAN et al., 2006; MS, 2007).

2.7.2 Diagnóstico molecular

A biologia molecular proporciona a identificação de *Leishmania* em casos de doenças subclínicas, casos com poucos parasitos, no acompanhamento do tratamento e confirmação diagnóstica. A PCR convencional 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 (GOMES et al., 1999; RAMOS et al., 1996; RODRIGUES, 2000; 2002; SINGH, 1997).

Embora várias abordagens moleculares tenham sido desenvolvidas para o diagnóstico da leishmaniose e a PCR seja uma técnica altamente sensível e específica, trata-se de um teste sofisticado para uso na rotina laboratorial, com exigências técnicas e

custo elevado, limitando-se a laboratórios de referência e/ou clínica médica (REITHINGER et al., 2007).

2.7.3 Diagnóstico imunológico

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 (ELISA), western blot e citometria de fluxo.

A detecção da imunidade celular através da IDRM tem sido empregada como o importante recurso no diagnóstico imunológico da LTA, dada sua grande sensibilidade e especificidade. 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, 2007). Além disso, o teste não diferencia infecção de doença e nem doença ativa de pregressa (WEIGLE et al., 2002; REITHINGER et al., 2007; GOTO; LINDOSO; 2010).

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. Estes testes apresentam controvérsias no diagnóstico LTA, principalmente considerando a baixa sensibilidade, especificidade e pouca reprodutibilidade. Além disso, podem apresentar reações cruzadas com outros tripanosomatídeos. Sabe-se ainda que baixos níveis de anticorpos são observados por estas técnicas, e que ocorre ausência de correlação entre níveis de anticorpos circulantes com a presença de infecção ativa (KAR, 1995; PASSOS et al., 2000; BRITO et al., 2000; 2001; SCHALLIG; OSKAM, 2002; SAVANI et al., 2003; ALVES; BEVILACQUA, 2004).

A IFI é uma técnica amplamente utilizada no diagnóstico da LTA, na qual é observada frequentemente, reações cruzadas com outros tripanosomatídeos, ocorrendo falso-positivos com soros de pacientes portadores de doença de Chagas e leishmaniose visceral, por exemplo (VEXENAT et al. 1996, BRITO 2008), bem como com soros de

pacientes portadores de hanseníase e tuberculose (KAR 1995). Além disso, ocorre grande variabilidade de resultados em técnicas sorológicas que dependem da natureza do antígeno; que pode estar associada aos diferentes antígenos utilizados e principalmente pela forma como foram produzidos e purificados (TAVARES et al. 2003).

Romero et al. (2005) mostrou que ocorre maior sensibilidade na técnica de ELISA em relação a IFI. O ELISA consiste em uma metodologia de realização simples e rápida, bastante utilizada nas investigações científicas. Embora mais prático tem sido menos utilizado na rotina laboratorial por apresentar custo mais elevado e exigências laboratoriais superiores à IFI (MACHADO, 2004). O Western blot tem sido mais utilizado no diagnóstico da LVA (KAR 1995). Em estudo comparativo, Brito (1999) demonstrou que a técnica de Western blot apresentou maior sensibilidade e especificidade em relação as técnicas de IFI e ELISA.

Vários esforços têm sido feitos para desenvolvimento de uma abordagem sorológica confiável para o diagnóstico da LTA usando preparações de antígenos para detectar anticorpos anti-*Leishmania* (GONÇALVES et al., 2002; RYAN et al., 2002). Um método confiável para o diagnóstico baseado na citometria de fluxo para detecção de anticorpos antiformas de *L. (V.) braziliensis* foi descrito por Rocha et al. (2002; 2006). 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 tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência.

Carvalho Neta et al. (2006) estabeleceu a utilização da citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina pela detecção de anticorpos antipromastigotas fixadas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Os cães incluídos neste estudo foram selecionados com base no resultado do teste de IFI, garantido o desempenho da nova metodologia na identificação de cães positivos ou não. Recentemente autores perceberam que apesar da aplicabilidade prática da técnica de citometria de fluxo no diagnóstico da LTA, a utilização dos parasitos vivos apresentava algumas desvantagens práticas, como risco de contaminação. Sendo assim, foi proposto a utilização das *Leishmanias* fixadas, garantindo a alta sensibilidade (99%) e especificidade (100%) da tecnologia no diagnóstico da LTA (PISSINATE et al., 2008).

Neste estudo, os anticorpos foram incubados na presença de parasitos fixados de *Leishmania amazonensis*, e para garantir a aplicabilidade do teste foram incluídos pacientes com outras infecções (leishmaniose visceral, doença de Chagas e malária), descartando a possibilidade de reação cruzada no diagnóstico.

Considerando as aplicabilidades da citometria de fluxo descritas por Martins-Filho et al., (1995), como uma metodologia com sensibilidade superior aos diferentes protocolos propostos de detecção convencionais, o presente trabalho busca uma metodologia alternativa através da pesquisa de anticorpos IgG de *L.(V.) braziliensis*. Dessa forma, acreditamos que a aplicação da citometria de fluxo, na detecção de LTA em pacientes antes e após-tratamento possa contribuir para a obtenção de um método de maior sensibilidade e especificidade, com aplicação diagnóstica e como critério de cura na LTA.

3 JUSTIFICATIVA

Em virtude das manifestações clínicas da LTA se assemelharem a lesões de outras doenças e pelo fato da existência de limitações nos métodos de diagnósticos convencionais, o diagnóstico da LTA demonstra dificuldades, pois é realizado pela associação dos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (BRITO et al., 2000; KAR, 1995). Em 2002, Rocha et al. descreveram o uso da citometria de fluxo para diagnóstico, verificando que esta técnica, comparada a outras, permite a reatividade de anticorpos dirigidos contra antígenos de membrana do parasito, evitando reações com estruturas intracitoplasmáticas, alvos de reatividade cruzada com outros tripanosomatídeos. Também permite a análise quantitativa dos anticorpos e o procedimento de marcação é simplificada pela utilização de anticorpos conjugados diretamente a fluorocromos. Além disso, outro estudo proposto por Rocha et al. (2006) abriu perspectivas para o monitoramento de cura pós-terapêutica. Portanto, o presente estudo pretendeu contribuir para o entendimento da resposta imune relacionada especificamente à evolução clínica de pacientes com LTA em Pernambuco, através da pesquisa de anticorpos IgG anti-formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, pela técnica de citometria de fluxo, e no monitoramento de cura pós-terapêutica .

4 OBJETIVOS

4.2 Objetivo Geral

Analisar o desempenho da técnica de citometria de fluxo como meio de avaliação clínica-laboratorial em portadores de leishmaniose tegumentar americana ativa e após cura clínica.

4.3 Objetivos Específicos

- Caracterizar a população de estudo quanto aos aspectos clínicos e laboratoriais;
- Comparar as técnicas de reação de imunofluorescência indireta e citometria de fluxo na avaliação clínica-laboratorial dos pacientes antes e após cura clínica;
- Avaliar a aplicabilidade da citometria de fluxo no monitoramento pós terapêutico dos pacientes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Tipo de estudo

O estudo foi 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).

5.2 População de estudo

Os pacientes do presente estudo foram procedentes de área endêmica para LTA em Pernambuco, com descrito na Tabela 5. Foram selecionados 14 pacientes, de ambos os sexos, com idade superior a 13 anos, portadores de lesões ativas. Os pacientes receberam atendimento no ambulatório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), onde ficaram cientes do objetivo do estudo e foram acompanhados para realização de procedimentos para coleta de 10 mL de sangue antes e 10 mL após tratamento quimioterápico com Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina), sob orientação médica.

5.2.1 Considerações éticas

Prosseguimos com os procedimentos para coleta de sangue somente após o paciente concordar em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) (anexo 1 e 2). O grupo controle (n=10) foi constituído por indivíduos residentes em área não endêmica para LTA, somente após concordar em assinar o TCLE (anexo 3). Foram coletados 10 mL de sangue do grupo de controle negativo, que foi 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.

5.3 Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes

Além da avaliação clínica e epidemiológica, os pacientes foram submetidos a alguns procedimentos laboratoriais para confirmação da doença. Os exames incluíram a) pesquisa direta realizada em material obtido através de escarificação da borda da lesão, utilizando lâmina de bisturi estéril; b) punção aspirativa realizada com seringa descartável contendo 0,3mL de solução salina estéril, aplicada na borda da lesão e posterior aspirado do conteúdo para inoculação em hamster; c) biópsia executada com punch medindo 4-6 mm de diâmetros e parte dos fragmentos retirados da borda da lesão ativa destinada ao isolamento do parasito e realização da extração para obtenção do DNA; d) Teste de intradermorreação de Montenegro (IDRM) foi realizado com preparação antigênica de promastigotas numa concentração de 10^9 , onde 0,1 a 0,2 mL foi aplicado na região intradérmica, na face anterior do antebraço, utilizando seringa e agulha de insulina; f) imunofluorescência indireta (IFI) e g) reação em cadeia de polimerase (PCR), ambas técnicas foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por De Bruijin; Barker, 1992.

5.4 Obtenção das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

Inicialmente formas promastigotas da cepa de referência (MHOM/BR/75/M2903) mantidas *in vitro* no laboratório de Imunogenética/CPqAM/FIOCRUZ/PE, foram expandidas em meio Schneider's até atingir a fase exponencial. Em seguida, os parasitos foram transferidos para tubos de polipropileno de 50mL, e foram submetidos a baixa centrifugação ($7 \times g$), 25°C por 10 minutos. Em seguida, os parasitos 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 parasitos foram lavados em solução Salina tamponada contendo 10% de SFB (soro fetal bovino), por três vezes, a 4°C , $871 \times g$

durante 10 minutos. O sedimento formado foi homogeneizado cuidadosamente. Alíquota de parasitos da suspensão foi contada e a concentração ajustada para o ensaio de citometria de fluxo.

5.5 Obtenção de soro

A partir do sangue coletado em tubo Vacutainer, o soro foi obtido após centrifugação a 400 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. As amostras de soros 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 aliqotado e estocado a -20 °C até sua utilização.

5.6 Reação de imunofluorescência indireta

O teste de IFI foi realizado em colaboração com o laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. As lâminas, contendo a suspensão antigênica de promastigotas de leishmania fixadas (promastigotas de *L.major*-like /MHOM/BR/71/49), foram recobertas com 20 µl das amostras dos soros diluídos na razão 1:20 até 1:320 em PBS 0,01 M, pH 7,2. Foram adicionados dois soros padrões (positivo e negativo), e incubados em câmara úmida por 30 minutos à 37 °C. Após incubação, foi retirado o excesso de soros das lâminas, lavando-as por imersão em PBS, pH 7,2 por três vezes em intervalos de 10 minutos. As lâminas foram secas em papel toalha. Uma diluição na razão de 1:100 de anti-IgG humana (específica para cadeia pesada) conjugada ao isotiocianato de fluoresceína-FITC (Biolab Mérieux) preparada em azul de Evans (48 mg%) na solução tampão de PBS, (previamente diluído na razão 1:10 no mesmo tampão), foi colocado sobre as lâminas, incubando-se nas mesmas condições anteriores. Após a reação, as lâminas foram lavadas três vezes por 10 minutos em PBS e secas com papel toalha. A montagem foi feita com glicerina tamponada pH 8,5 e, em seguida, a lâmina foi observada no microscópio de fluorescência, com a objetiva de 250 x.

5.7 Citometria de fluxo

O ensaio de citometria de fluxo para a pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* foi realizado de acordo com Rocha et al. (2002). Suspensão de parasitos ($2,5 \times 10^5$ /poço) foi incubada em placas de 96 poços, fundo em “U” a 37 °C por 30 minutos na presença de diferentes diluições do soro das amostras (1:64 a 1:8192). Após incubação com soros, os parasitos foram lavados duas vezes com 150 uL de PBS-10% SFB (1000 x g por 10 minutos, a 4 °C). Em seguida, os parasitos foram incubados a 37 °C por 30 minutos protegido da luz, na presença de anti-IgG humana conjugada ao isotiocianato de fluoresceína-FITC (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) diluída 1:1200 in PBS-10% SFB. Após a segunda lavagem, parasitos marcados com FITC foram fixados por 30 minutos antes de analisadas no citômetro de fluxo (FACScalibur- Becton Dickinson) e identificadas através do software “Cell Quest Pro” interligado ao citômetro. As leituras das amostras no citômetro de fluxo foram realizadas num período máximo de 24 horas após a fixação dos parasitos.

5.7.1 Análise dos dados

A análise da reatividade de anticorpos anti-formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* foi feita inicialmente pela seleção da população celular de interesse (Figura 5). Sendo a população de pequeno tamanho (cerca de 5-7µm) e de pequena complexidade interna (tripanosomatídeos), os ganhos de voltagem para os parâmetros de tamanho e granulosidade foram ajustados, ambos na escala LOG, para permitir a identificação do parasito em gráficos do tipo FSC (tamanho) x SSC (granulosidade). As formas promastigotas apresentaram uma distribuição característica e homogênea em gráficos de tamanho x granulosidade, permitindo o posicionamento do marcador sobre a região correspondente à população de interesse (R1). Utilizando histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de parasitos, foi analisada a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada. Para cada amostra individual foram adquiridas informações relativas aos parâmetros tamanho, granulosidade e intensidade relativa de fluorescência de 20.000 parasitos. Nesse estudo foi empregado anticorpo marcado com FITC, correspondente à fluorescência do tipo 1 (FL1-fluorescência verde). Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos após incubação com soros obtidos de pacientes portadores leishmaniose

tegumentar e soros controle foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) observados para cada teste individual em relação ao controle do conjugado. O PPFP foi 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 foi 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 foram obtidos os valores de PPFP para amostras individuais.

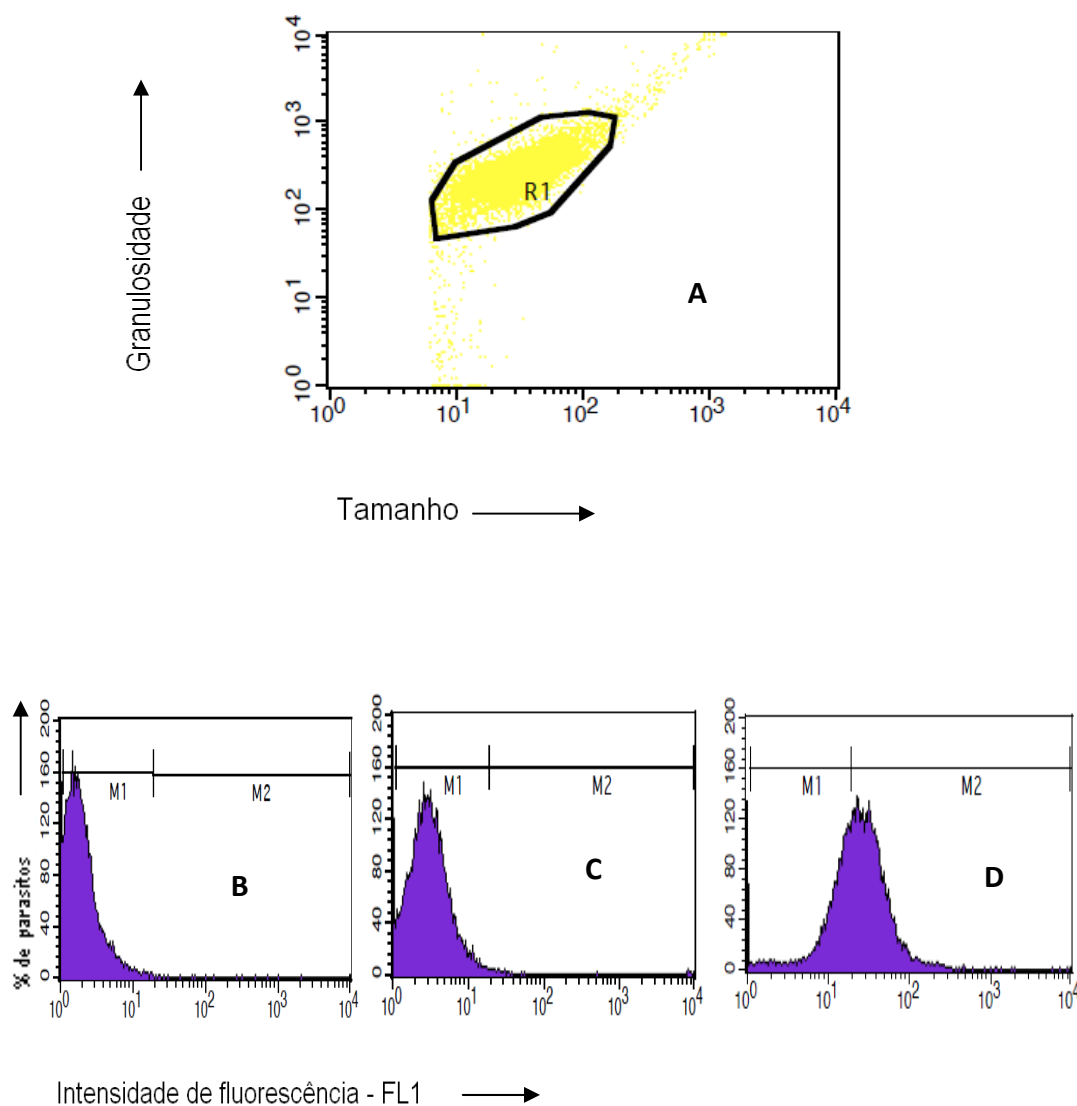


Figura 5 - Seleção da população de formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, utilizando-se os parâmetros de tamanho e granulidade (A). Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes (PPFP) obtidos com controle interno da reação (B), após a incubação com um soro de um indivíduo não infectado (C) e um soro de um paciente portador de LTA (D). O posicionamento do marcador (M2) segue sempre o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle do conjugado.

5.8 Análise estatística

Para avaliar os níveis de reatividade de IgG anti-*Leishmania*, pela IFI e pela citometria de fluxo, antes e após tratamento, foi aplicado o teste de Wilcoxon. O teste foi realizado utilizando o programa estatístico MedCalc Statistical. Todas as conclusões foram tomadas no nível de significância de 5%.

Os índices de desempenho da IFI e da citometria de fluxo foram 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 4 e foram definidos 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 4: Categorias para os resultados do teste diagnóstico dos pacientes.

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

Com base nestes fundamentos, os índices sensibilidade e especificidade foram calculados. A sensibilidade foi calculada pela relação $a/(a+c)$ traduzindo, assim, a proporção de pacientes portadores LTA (presença de lesão), nos quais os testes IFI ou citometria de fluxo foram positivos. Já, a especificidade diz respeito à proporção de indivíduos sem manifestação clínica de LTA (ausência de lesão) cujo teste é negativo sendo, portanto, determinada pela relação $d/(b+d)$.

5.8.1 Definição do ponto de corte

Para o teste de IFI, foram considerados resultados positivos, valores iguais ou superiores a titulação de 1:20. Para a citometria de fluxo, inicialmente utilizamos o ponto de corte sugerido por Martins-Filho (1995), com a finalidade de analisar a reatividade do teste, onde PPFP > 20% foram considerados positivos para o ensaio.

5.8.2 Curva ROC – *Receiver Operating Characteristic Curve*

Para avaliação da acurácia global dos teste de IFI e citometria de fluxo, através do valor ASC (área sob a curva), onde quanto mais próxima a ASC do valor 1, significa que melhor foi o desempenho do teste. E também para identificar com precisão o ponto de corte ideal para o teste de citometria de fluxo que permitisse menor número de resultados errôneos no ensaio, ou seja, uma melhor capacidade em diagnosticar doente e não-doente.

5.8.3 Intervalo de Confiança

Sempre que possível, o resultado foi expresso com seu respectivo intervalo de confiança (IC_{95%}) com a finalidade de fornecer informação a respeito da precisão do valor estimado, que está relacionado com a amplitude do referido intervalo, sendo que intervalos mais estreitos correspondem a estimativas mais precisas.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da população de estudo

Os pacientes com LTA do estudo foram avaliados segundo os critérios de faixa etária, sexo, localidade de origem, forma clínica, número de lesões, localização das lesões, tempo de evolução da doença, número de ampolas para o tratamento, além dos diagnósticos parasitológicos e imunológicos. Essas informações estão descritas nas Tabelas 5 e 6.

Foram selecionados 14 indivíduos com LTA ativa que obedeceram aos critérios de inclusão e exclusão, sendo 9 do sexo masculino (64%) e 5 do sexo feminino (36%). A faixa etária variou de 13 a 51 com uma média de 35 anos. Os pacientes foram provenientes do distrito de Aldeia (n=2), e dos municípios de Moreno (n=10), de Amaraji (n=1) e de Vitória de Santo Antão (n=1) respectivamente, situados a 10 km, 28 km, 96 km, 51 km da cidade do Recife. Destas localidades, as duas primeiras pertencem à região metropolitana do Recife e as demais localidades pertencem à região da Zona da Mata, sendo consideradas áreas endêmicas em PE.

Apenas um paciente apresentou a forma cutânea disseminada com mais de 20 lesões papulosas, distribuídas por toda superfície corporal. Um paciente apresentou a forma mucocutânea. Todos os outros pacientes apresentaram lesões ulceradas com bordas elevadas e fundo granulomatoso, distribuídas em áreas descobertas do corpo. Em relação ao número de lesões, 64,29% apresentaram apenas uma lesão, 7,14% apresentaram duas lesões e 28,57% três lesões ou mais. O tempo de evolução da doença, ou seja, do surgimento da doença até a procura do núcleo de saúde dos municípios variou de um mês até 36 meses.

Tabela 5: Características dos pacientes em relação ao sexo, faixa etária, localidade de origem, forma clínica, número de lesões, local das lesões, tamanho das lesões, tempo de evolução da doença e número de ampolas.

Paciente	Sexo	Idade	Localidade	Forma Clínica	Nº de lesões	Local das lesões	Tamanho das lesões (cm ²)	Evolução (meses)	Nº de ampolas
1	M	17	Moreno	CL	03	2 Região lombar E	9; 21;0.5	1	49
2	F	46	Moreno	CL	03	Axila Perna E Perna D 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 Antão	CL	01	Tornozelo D	3	2	20
13	M	33	Moreno	CL	01	Perna D	20.25	36	30
14	F	13	Moreno	CL	03	Glúteo Coxa Perna D	22.5; 10; 10	12	30

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

O tratamento com Glucantime foi realizado como descrito na metodologia, todos os pacientes apresentaram cicatrização completa das lesões ao final do esquema terapêutico (Figura 6). Na maioria (78,57%) dos pacientes o esquema terapêutico foi composto por uma série (20 a 30 dias). Em 14,29% e 7,14% dos pacientes o tratamento foi composto por duas e três séries, respectivamente (Tabela 5). Após o término do tratamento, os pacientes foram acompanhados por um período de 12 meses para confirmação da cura clínica e verificação do aparecimento de novas lesões e recidivas. Além disso, foram novamente submetidos à coleta de sangue venoso para a avaliação após tratamento.



Figura 6: Fotos representativas da cicatrização das lesões dos pacientes. Fonte: Reis, 2007.

6.2 Diagnóstico laboratorial

Os pacientes tiveram diagnóstico laboratorial confirmado para LTA em colaboração com o Serviço de Referência em Leishmanioses do CPqAM e com o laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. Todos os pacientes foram diagnosticados como positivos em pelo menos um dos testes realizados.

A intradermoreação de Montenegro (IDRM) apresentou resultado positivo, ou seja, enduração igual ou maior que 5 mm em (12/14) 85,71% dos pacientes. Um paciente apresentou enduração menor que 5 mm; portanto, resultado negativo. Por motivos operacionais, apenas um paciente não realizou o teste. Vale ressaltar que esses dois pacientes foram positivos em outros testes. A IDRM apresentou uma forte resposta de hipersensibilidade cutânea, ou seja, endurações maiores que 10 mm em (8/14) 57,14% dos pacientes.

Além da IDRM, foram realizadas a PCR, em 13 pacientes, com (12/13) 92,31% de positividade. A pesquisa direta apresentou 42,86% de positividade nos 14 pacientes avaliados. Em seis indivíduos (42,86%), o parasito foi isolado em meio de cultura NNN.

Tabela 6: 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	-	+	N
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	N

IDRM= Intradermoreação de Montenegro; IFI= Imunofluorescência; PCR= Reação em cadeia de polimerase; += positivo; - = negativo; NR= não realizado; S= sim; N=não.

6.3 Imunofluorescência indireta

Os pacientes, que demonstraram títulos a partir de 1:20, foram considerados positivos na IFI, conforme metodologia estabelecida no laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. 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 foram positivos para o teste de imunofluorescência indireta (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados do teste de imunofluorescência indireta dos pacientes antes e após o tratamento com Glucantime.

Paciente	AT	PT – 1 ano	PT – 2 anos	PT - 5 anos
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	-

IFI= imunofluorescência indireta; AT= antes do tratamento; PT= pós-tratamento; NR= não-realizado;(-) = não reativo.

Para avaliar a aplicabilidade do método de IFI em identificar LTA em atividade clínica, foi realizada a avaliação da reatividade de IgG total dos soros dos indivíduos (Figura 7), em termos de sensibilidade e especificidade. Estes pacientes foram classificados quanto à presença da LTA (AT) e a ausência da LTA (1, 2 e 5 anos - PT) e empregou-se o ponto de corte, representado na figura pela linha tracejada horizontal. Os pacientes com títulos IFI $\geq 1:20$ foram positivos e os pacientes com IFI não reativo nestes títulos foram negativos.

Tabela 8: Tabela para cálculo de sensibilidade e especificidade para o teste de imunofluorescência indireta (IFI) dos pacientes 1,2 e 5 anos após o tratamento da leishmaniose tegumentar americana.

		LTA			
		AT	1PT	2PT	5PT
IFI	Positivo	13	8	7	5
	Negativo	1	5	3	5
Total		14	13	10	10

AT= antes do tratamento; PT= pós tratamento.

6.4 Citometria de fluxo

A reatividade do ensaio de citometria de fluxo, foi expressa a partir da média dos valores da porcentagem de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) dos soros (Figura 8), 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 PPFP, representado na figura pela linha horizontal tracejada, como proposto por Martins-Filho (1995). A análise das curvas de titulação de anticorpos IgG anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes classificados quanto a presença de LTA (AT) e a ausência de LTA (1, 2 e 5 anos PT), expressos como médias dos 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 e 1, 2 e 5 anos PT (Figura 8).

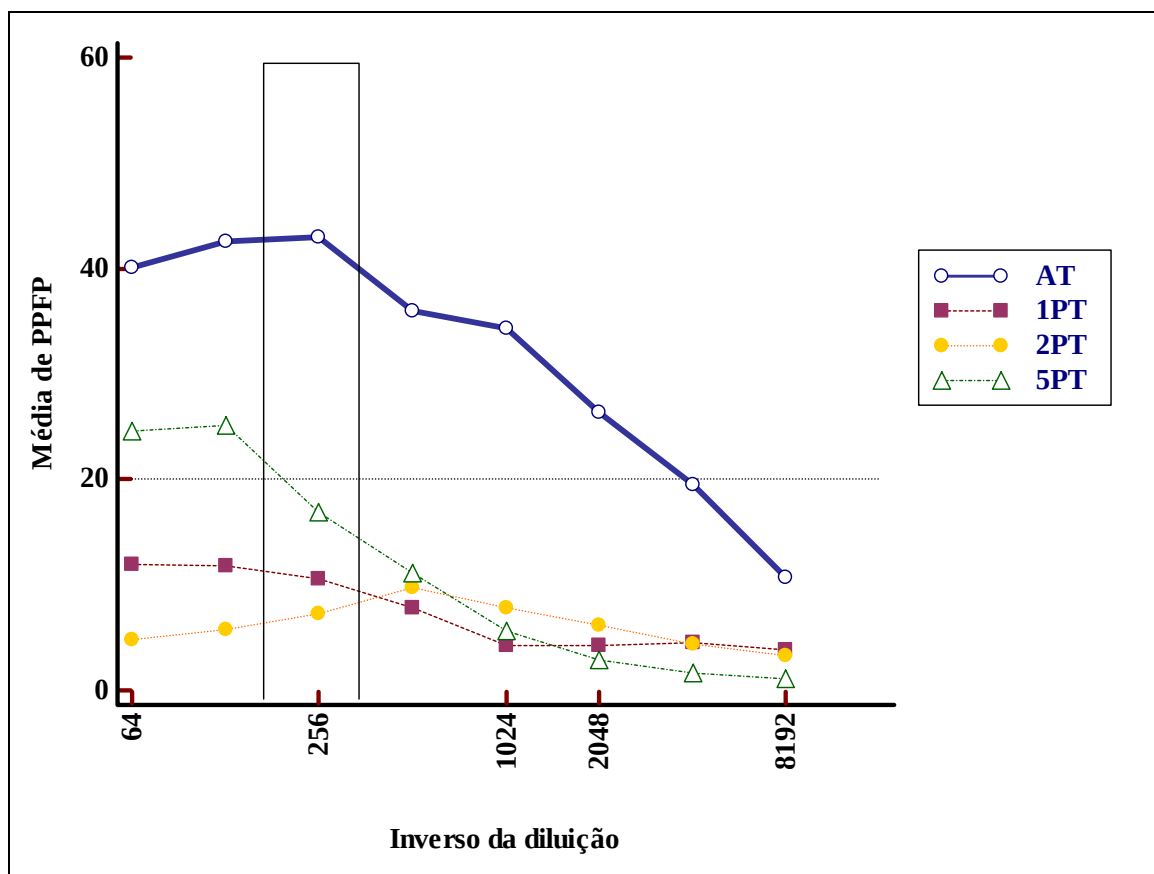


Figura 8: Curvas de titulação de anticorpos IgG anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes classificados quanto a presença de lesão (AT) e a ausência de lesão (1, 2 e 5 anos PT). A linha pontilhada corresponde ao ponto de corte de 20% de PPFP.

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 9). Empregou-se ponto de corte de 20% de PPFP, demonstrando 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, 1, 2 e 5 anos PT com valores de PPFP restritos a uma região de baixa reatividade, ou seja, negativos para o ensaio de citometria de fluxo.

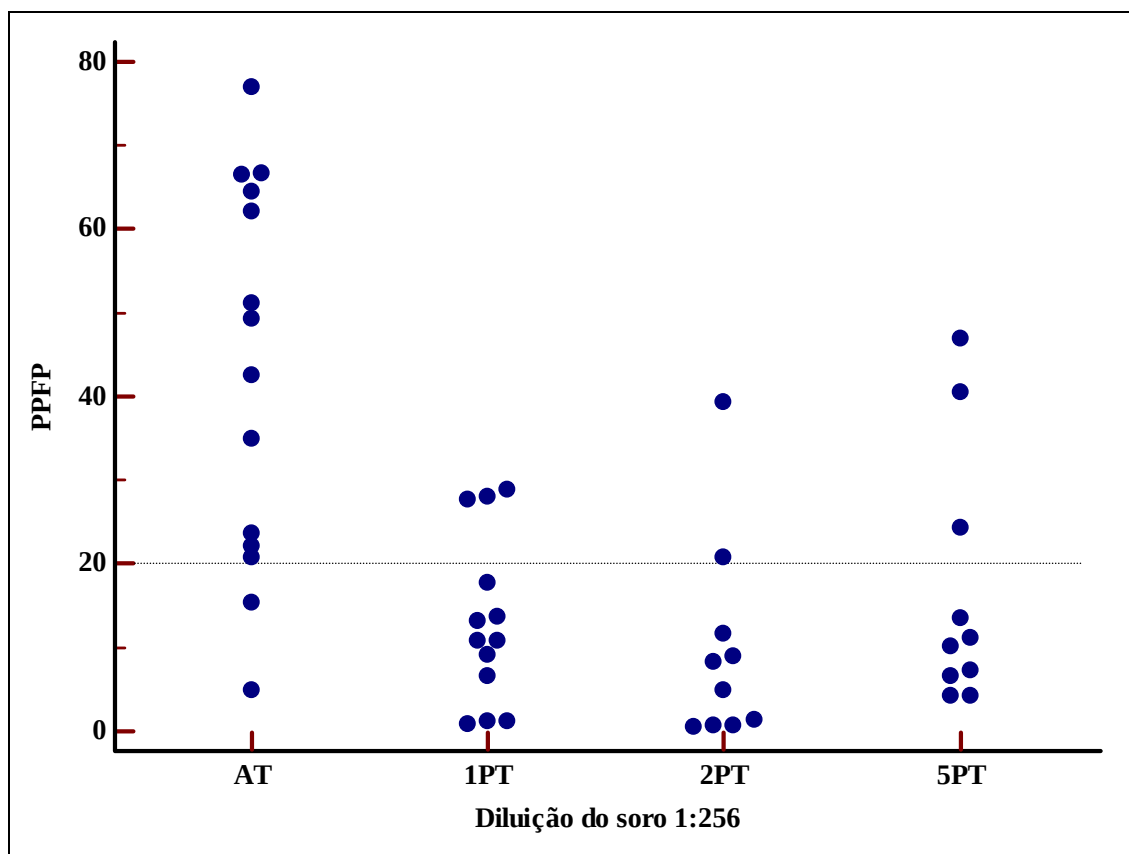


Figura 9: Avaliação da aplicabilidade do ensaio de citometria de fluxo na identificação de pacientes com LTA ativa, a partir dos soros de pacientes da região de reatividade com título diferencial entre AT e 1, 2 e 5 anos PT. A linha pontilhada corresponde ao ponto de corte de 20% de PPFP.

Os pacientes analisados tiveram sua sensibilidade e especificidades nos diferentes tempos PT calculadas de acordo com os dados descritos na Tabela 9. Apresentaram sensibilidade = 86%; especificidade = 77% em pacientes com 1 ano PT; especificidade = 80% em pacientes com 2 anos PT e especificidade = 70% em pacientes com 5 anos PT para o ensaio de citometria de fluxo.

Tabela 9: Tabela para calculo de sensibilidade e especificidade para o teste de citometria de fluxo dos pacientes 1,2 e 5 anos após o tratamento da leishmaniose tegumentar americana.

		LTA			
		AT	1PT	2PT	5PT
Citometria de fluxo	Positivo	12	3	2	3
	Negativo	2	10	8	7
Total		14	13	10	10

AT= antes do tratamento; PT= pós tratamento.

6.5 Estudo das Curvas ROC

Os valores dos resultados dos títulos da IFI e citometria de fluxo, na diluição do soro de 1:256, foram utilizados a fim de se construir as curvas ROC para os testes (Figura 10). Com a análise das curvas ROC, observamos que 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, obteve-se uma acurácia para o teste de IFI menor em relação ao teste de citometria de fluxo.

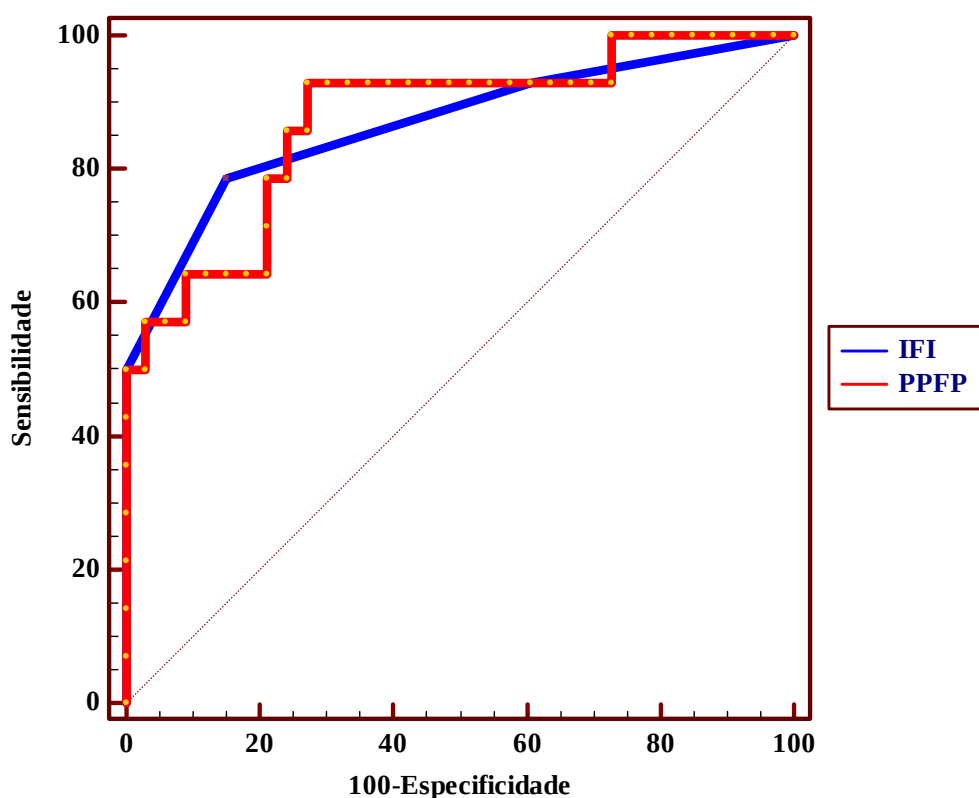


Figura 10: Comparação entre as curvas ROC de IFI e citometria de fluxo, construídas a partir do desempenho, sensibilidade e 100- especificidade dos testes avaliados. 0,9 e 0,8 correspondem as ASC= área sob a curva da citometria de fluxo e IFI, respectivamente.

Além disso, a curva ROC proporcionou o conhecimento do melhor ponto de corte para o ensaio de citometria de fluxo. A Figura 11 apresenta os valores de sensibilidade e especificidade em função dos diferentes pontos de corte, onde um ponto de corte em 20% da PPFP com sensibilidade de 86% e especificidade de 77% é o melhor para demonstrar o desempenho do teste. Em relação ao ponto de corte utilizado para IFI, quando analisado pela curva ROC demonstrou que com título de 1:20 a sensibilidade é de 78% e especificidade de 85%, demonstrando que o teste apresentou baixa sensibilidade.

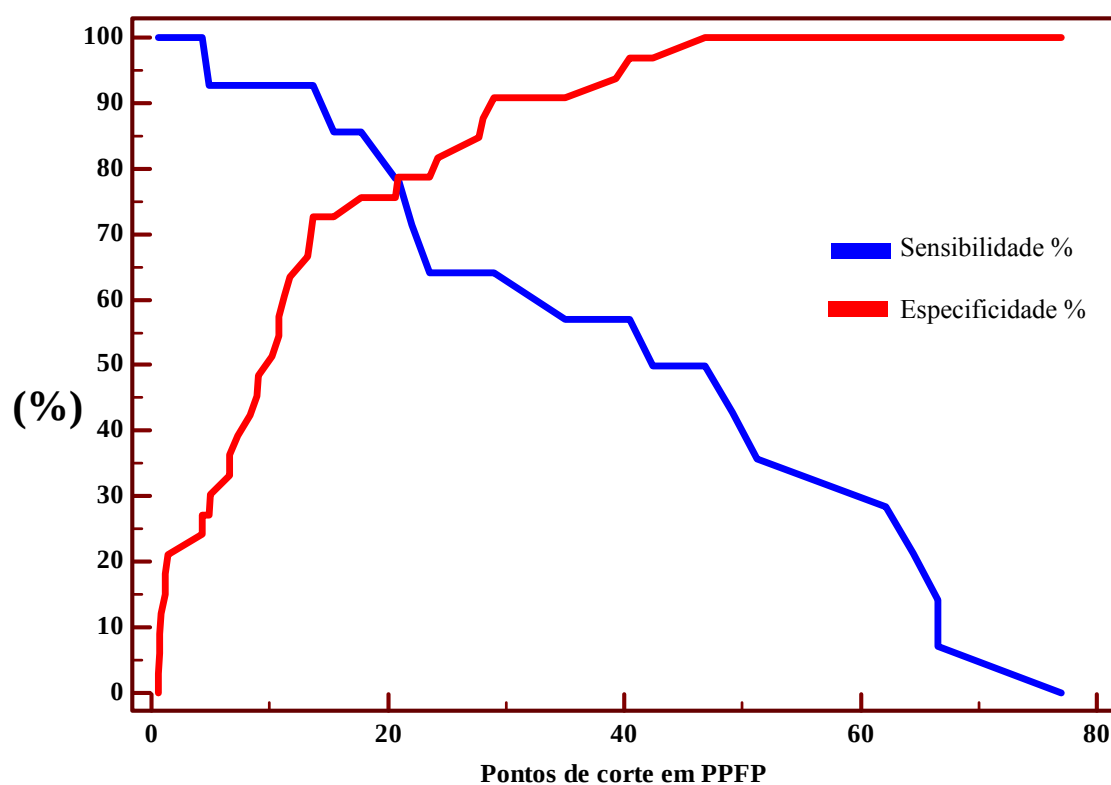


Figura 11: Curvas de sensibilidade e especificidade da citometria de fluxo obtidas a partir de diferentes pontos de corte expressos em PFP.

7 DISCUSSÃO

A *Leishmania (V.) braziliensis* é a principal espécie responsável pela doença no Brasil, apresentando ampla distribuição territorial, sendo classificada como uma das espécies de maior importância para a saúde pública. É responsável por um amplo espectro de lesões, o que torna o diagnóstico clínico nem sempre simples ou imediato. Além disso, as suas lesões são facilmente confundidas como as encontradas em outras infecções cutâneas, tais como as neoplasias cutâneas, sífilis, paracoccidioidomicose, tuberculose cutânea e hanseníase, reforçando a necessidade de um diagnóstico diferencial (MARZOCHI 1992; PIRMEZ et al. 1999; ÁVILA et al., 2004).

Todos os 14 pacientes do estudo foram provenientes de área endêmica para LTA na Zona da Mata de Pernambuco ou Moreno. Observou-se uma prevalência da doença em indivíduos do sexo masculino (64%), adultos e trabalhadores da zona rural. A LTA, em geral, está associada às áreas rurais, em atividades de exploração e desmatamento de florestas e agrícolas (BRITO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2006; REITHINGER et al., 2010). Em relação às formas clínicas observadas nesse estudo, a grande maioria apresentou a forma cutânea localizada com lesões ulceradas em áreas descobertas do corpo (86%). Apenas um indivíduo apresentou a forma mucocutânea e um à forma disseminada. A existência das lesões nas áreas descobertas do corpo, normalmente membros superiores e inferiores, pode ser explicada pelas atividades ocupacionais em áreas rurais (REITHINGER et al., 2010). Concordando com outros estudos realizados em PE, observou-se a maior ocorrência da forma cutânea localizada (ANDRADE et al., 2005; BRANDÃO-FILHO et al., 1999). A redução do número de casos de leishmaniose mucocutânea é provavelmente devido ao diagnóstico precoce e tratamento adequado da infecção.

Quanto ao esquema terapêutico da LTA, a doença ainda é tratada primariamente com antimoniais pentavalentes, agentes quimioterápicos com terapêutica prolongada, de alto custo podendo causar sérios efeitos colaterais (AMEEN, 2010; CARVALHO, 2007). Soto et al (2004) em um estudo comparativo entre os antimoniais Glucantime e Pentostam, demonstraram a elevada toxicidade destes antimoniais e o alto custo do tratamento com Glucantime, onde uma ampola de 5 ml custa de US\$ 4-6 dólares, o que para um tratamento de 60 ampolas equivale US\$ 240-360 dólares; justificando a

importância da confirmação diagnóstica laboratorial da LTA, bem como a busca por um teste sorológico considerado seguro da suspeita de LTA.

Até o momento, a pesquisa direta, o isolamento em cultura, a inoculação em animais, são os melhores parâmetros para o diagnóstico da LTA, especialmente em locais com infra-estrutura laboratorial precária, embora esses métodos apresentem limitações, não sendo capazes de identificar a LTA em todos os pacientes (GOTO; LINDOSO, 2010). Contudo, esses métodos parasitológicos convencionais são considerados invasivos para os pacientes (PERINOTO et al., 2010). Embora 100% específicos, apresentam baixa sensibilidade no diagnóstico da doença, principalmente por *L.(V.) braziliensis*, espécie mais prevalente em Pernambuco nas áreas selecionadas para o nosso estudo. Além disso, a contaminação é um perigo constante para o isolamento do parasito devido ao longo tempo necessário para o crescimento em cultura. O sucesso para a identificação microscópica de amastigotas em lâminas, varia de acordo com o número e dispersão de parasitos presentes nas lesões e/ou experiência do examinador (CHARGUI et al., 2005; BENSOUSSAN et al., 2006; REITHINGER et al., 2007; FAGUNDES et al., 2010).

Várias abordagens moleculares têm sido desenvolvidas para o diagnóstico das leishmanioses com base na detecção de DNA de *Leishmania* na identificação da espécie envolvida (GOTO; LINDOSO, 2010; FAGUNDES et al., 2010; NASEREDDIN; JAFFE, 2010). No entanto, trata-se de um teste de elevado custo para uso na rotina laboratorial, limitando-se a laboratórios de referência e clínica médica (PERINOTO et al., 2010; REITHINGER et al., 2007). Além disso, pode se apresentar positiva por vários anos após o tratamento (BLUM et al., 2004; FAGUNDES et al., 2010; MARTINS et al., 2010).

No que se refere ao diagnóstico imunológico, a IDRM é um dos testes mais utilizados no diagnóstico da LTA devido sua elevada especificidade e sensibilidade, além de ser um teste simples e de baixo custo. Embora em casos de infecção recente, na forma difusa e em pacientes imunodeprimidos o resultado pode ser negativo, o que compromete a sua alta sensibilidade (VIANA et al., 2010). Além disso, em áreas endêmicas para LTA, o teste não diferencia infecção de doença, nem doença ativa de progressa (WEIGLE et al., 2002; REITHINGER et al., 2007; GONZALEZ et al., 2009), comprometendo também sua especificidade. Estudos têm demonstrado resultados positivos em pacientes curados ou assintomáticos para leishmaniose visceral e há relatos

de reatividade cruzada em pacientes com doença de Chagas, esporotricose, hanseníase, blastomicose, tuberculose ganglionar e disseminada (MARZOCHI et al., 1980; CARVALHO 2007; BARRIO et al., 2007; VENAZZI et al., 2006). Da Costa et al (1996) relataram que quando o antígeno é estocado por períodos longos, especialmente em inquéritos epidemiológicos, pode ocorrer degradação proteica, comprometendo os resultados. Com isso, consideraram que ocorrem limitações da IDRM em relação a preparação do antígeno que podem afetar a sua eficácia na detecção da leishmaniose (GARCIA et al., 2005).

A IFI, ELISA e o Western blot são os testes sorológicos mais utilizados no diagnóstico da LTA (BRITO et al., 2000; MARTÍN-RABADÁN et al., 2010; READY, 2010). Na LTA, os testes sorológicos apresentam resultados variáveis, causados pela reduzida antigenicidade do parasito ou pelos baixos níveis de anticorpos circulantes (BRITO et al., 2000; ROCHA et al., 2002). Estudos relatam que, a sensibilidade e a especificidade desses testes são influenciadas, de forma importante, pela natureza do antígeno utilizado e que os antígenos de *Leishmania* obtidos até o momento são mais aplicáveis ao diagnóstico da leishmaniose visceral (UCHÔA et al., 2001; VARGAS-DUARTE et al., 2009; VIANA et al., 2010; MARCONDES et al., 2010), evidenciando uma carência de antígenos que permitam o desenvolvimento de métodos sorológicos seguros. Além destes fatores, a ausência de relação dos níveis de anticorpos circulantes com a presença de infecção ativa (ROCHA et al., 2002; 2006) e os altos níveis de reatividade cruzada com outras espécies da família Trypanosomatidae (KAR 1995, VEXENAT et al., 1996) são fatores relacionados ao baixo desempenho dos testes sorológicos no diagnóstico da LTA. Uchôa et al (2001) demonstraram que os métodos sorológicos convencionais neste, assim como outros estudos, têm utilizado como antígeno nos ensaios o lisado parasitário total ou parcial, embora essas preparações atendam as necessidades básicas da rotina laboratorial, por serem não infectantes, de fácil preparação em larga escala e possuírem estabilidade antigênica, o processo favorece o aparecimento de reações cruzadas devido a exposição de epítomos intracelulares homólogos presentes em outros parasitos.

Sendo assim, os desafios sócio-econômicos associados às dificuldades metodológicas em se estabelecer um diagnóstico seguro da LTA justifica o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas, principalmente no Brasil, onde se

observa uma expansão espacial da doença, tornando relevante a busca de novos métodos diagnósticos de maior sensibilidade e especificidade.

Para garantir a maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico de pacientes com LTA no trabalho, utilizamos a cepa de referência MHOM/BR/75/M2903 da espécie *L. (V.) braziliensis*, que a única espécie circulante em Pernambuco para LTA (BRITO et al., 2008; REIS et al., 2008). Szargiki et al. (2009) em estudo comparativo realizado com pacientes com LTA utilizando antígenos de *L. (L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis*, demonstraram que os métodos imuno-sorológicos atingem maiores sensibilidades quando é utilizado o antígeno homólogo. Quando utilizado o seu heterólogo, o número de reações inespecíficas aumenta em pacientes sem a infecção e com portadores de outras patologias. Sendo assim, a fim de se obter a melhor performance das reações sorológicas, utilizamos os seus antígenos homólogos.

Na avaliação do desempenho das amostras individualmente por citometria de fluxo, empregamos o ponto de corte de 20%, como proposto por Martins-filho et al. (1995) para avaliação sorológica na Doença de Chagas. Na escolha do ponto de corte foram consideradas também as características intrínsecas do grupo controle selecionado para garantir a especificidade do método. Utilizando o ponto de corte equivalente ao valor de PPFP=20%, nossos resultados evidenciaram a segregação dos pacientes AT e dos indivíduos PT em regiões distintas, mostrando a aplicabilidade da metodologia proposta com uma sensibilidade de 86% e especificidade de 77%. A maioria dos pacientes AT apresentou valores de PPFP restritos a uma região de alta reatividade ou resultados positivos (PPFP>20%), enquanto os indivíduos PT apresentaram valores de PPFP na região de baixa reatividade ou resultados negativos (PPFP≤20%). Isso não tinha sido possível através da análise dos títulos da IFI.

Embora os resultados sorológicos da IFI apresentem, em algumas situações, discordância em relação aos achados clínicos e parasitológicos devido à dificuldade do achado do parasito, principalmente em lesões crônicas, esta metodologia vem sendo utilizada como exame auxiliar no diagnóstico das leishmanioses (SAMPAIO et al., 2009; MOLESLEH et al., 1995). Como a reação de IFI, trata-se da técnica sorológica convencional mais utilizada como ferramenta complementar no diagnóstico da LTA. Por ser o método convencional de detecção de anticorpos indicado no diagnóstico da LTA por *Leishmania (V.) braziliensis*, optamos fazer a análise comparativa do desempenho do teste proposto com esta técnica.

A partir da construção da curva ROC para análise comparativa da acurácia global da IFI e da citometria de fluxo foi obtido a ASC dos testes. Elevada acurácia foi observada para a citometria de fluxo ($ASC=0,90$; $IC_{95\%}= 0,75-0,99$) e a baixa acurácia para a IFI ($ASC=0,8$; $IC_{95\%}= 0,78-0,99$). Esse resultado demonstrou o melhor desempenho da citometria de fluxo. A construção da curva ROC permitiu ainda a identificação e seleção de um melhor ponto de corte para a citometria de fluxo. Sendo assim, como através da curva ROC o valor de PPFP=20% correspondeu ao melhor ponto de corte, oferecendo melhor contrabalanço de sensibilidade e de especificidade, observou-se que o ponto de corte previamente proposto por Martins-Filho et al (1995) pode ser aplicado também para identificação de casos de LTA por citometria de fluxo da população em estudo utilizando o parasito da espécie *L. (V.) braziliensis*.

Na análise comparativa dos índices de desempenho, o valor de sensibilidade da IFI de 78%, demonstrou que o teste apresentava sensibilidade relativamente alta, embora ainda aquém do desejável. Por outro lado, a sensibilidade da citometria de fluxo, considerando o ponto de corte de PPFP=20%, foi de 86%. Isso demonstrou que a metodologia de citometria de fluxo aplica-se melhor ao rastreamento da LTA em estudos epidemiológicos ou como parte da pesquisa inicial em um paciente, uma vez que o novo teste foi freqüentemente positivo (12/14) na presença da doença. A sensibilidade encontrada para IFI concorda com outros estudos realizados. Reis et al (2008) ao avaliarem pela IFI 19 amostras de soros de pacientes portadores de LTA encontram 79% de positividade. Na avaliação de 54 pacientes portadores de LTA Romero et al. (2005) encontraram uma positividade de 79,6%. Enquanto Szargiki et al. (2009) ao avaliarem 81 pacientes portadores de LTA infectados por *L. (V.) braziliensis* encontraram uma alta sensibilidade para a IFI de 80,2%. Apesar dos valores de sensibilidade relativamente altos, estudos relatam que a sensibilidade da IFI para as formas cutâneas por *L. (V.) braziliensis* pode apresentar variação de 50- 80% (MARZOCHI, 1992; TAVARES et al., 2003).

Estudos demonstram que a sensibilidade de um método diagnóstico depende de aspectos multifatoriais inerentes a natureza de antígeno empregado, bem como o sistema de detecção intrínseco a uma determinada tecnologia (KAR 1995; ROMERO et al., 2005). Neste contexto, este estudo optou por trabalhar seletivamente com antígenos de membrana, disponíveis nos parasitos de *L. (V.) braziliensis*, associado ao elevado

desempenho da reação de citometria de fluxo. A capacidade do citômetro em contar 10.000 parasitos por ensaio e a possibilidade de se utilizar parasitos íntegros como fonte de antígeno, garantiram maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico de pacientes com LTA e contribuíram para a melhor performance e confiabilidade desta metodologia em relação a outras técnicas.

A especificidade encontrada para a IFI de 85% foi considerada elevada, quando comparada com a citometria de fluxo, que apresentou especificidade de 77%. Ainda assim, a IFI mostra-se limitada para confirmar o diagnóstico da LTA, uma vez que o teste apresentou título positivo na ausência da doença. Enquanto isso, a citometria de fluxo mostrou-se capaz de esclarecer o diagnóstico de LTA diante de um quadro clínico-epidemiológico sugestivo, uma vez que o teste freqüentemente apresentou valores de PPFP $\leq 20\%$ na ausência da doença. A análise dos dados permitiu concluir que a citometria de fluxo apresentou um ganho real em relação à IFI. Gontijo et al. (2002) descreveram uma reatividade de 21,5% para a IFI em indivíduos sem sinais clínicos de LTA residentes em área endêmica para a doença. Vários trabalhos atribuem os resultados falso-positivos nos testes sorológicos convencionais para as formas cutâneas da LTA a casos de reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* e anticorpos produzidos contra agentes etiológicos de outras doenças, como leishmaniose visceral e doença de Chagas (MARZOCHI 1992, VEXENAT et al. 1996). No entanto, atribuímos os resultados falso-positivos na citometria de fluxo a possibilidade de re-infecção, por se tratar de indivíduos imunologicamente sensibilizados de área endêmica. Comparando os índices de desempenho de ambos os testes, IFI e citometria de fluxo, evidenciou-se que a citometria de fluxo apresentou um desempenho superior ao teste convencionalmente utilizado.

Carvalho-Neta et al.(2006) descreveram o uso da citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina num estudo realizado com 60 cães. A partir do ponto de corte de 20% de PPFP foi possível diferenciar a população reativa e não-reativa para leishmaniose visceral, com sensibilidade de 96% e especificidade de 100%. O estudo demonstrou que os ensaios sorológicos baseados na citometria de fluxo constituem um campo com grandes possibilidades de crescimento devido à sensibilidade de detecção aumentada em relação a outros métodos, concordando também com Martins-filho et al. (1995).

O tempo de incubação da doença pode interferir no desempenho do teste, resultando em falso-negativos, pois os valores de PPFP em uma região de baixa reatividade ($PPFP \leq 20\%$) foram apenas observados em pacientes com LTA com menos de 60 dias de evolução. Dos dois pacientes negativos para citometria de fluxo, um apresentou IDRM negativa mostrando tratar-se de uma infecção muito precoce. Ambos foram positivos para IFI, AT e 1 e 2 anos PT, entretanto, em títulos de 1:40. Dada a subjetividade da técnica, esse título é questionável. Silveira et al. (1999) demonstraram em um estudo no Estado do Paraná, onde a população portadora de LTA foi classificada em função do tempo de evolução da lesão, que os pacientes com menos de um mês de evolução da lesão, apresentaram a IFI com 68,3% de positividade, já os pacientes com até três meses de evolução da lesão, apresentaram a positividade de 77,8%. Esses dados reforçam que, em algumas situações de lesões recentes, os títulos de anticorpos podem ainda ser muito baixos, não sendo possível sua detecção, mesmo por uma técnica com sensibilidade elevada como a citometria de fluxo.

Estudos chamam a atenção também para o tempo de desenvolvimento, e o número de lesões e a correlação destes com a reatividade por IFI, onde pacientes portadores de LTA com lesões cutâneas únicas e recentes geralmente apresentam títulos negativos ou baixos níveis de reatividade sérica. E que a estimulação antigênica do sistema imune seria maior em lesões múltiplas, devido à disseminação do parasito ou às várias inoculações do parasito pelo vetor (MENDONÇA et al., 1988; CHIARI et al., 1973a, b). Em nosso estudo não avaliamos a influência do número de lesões no desempenho da tecnologia, ressaltando que a população estudada era constituída principalmente por pacientes com lesão única e recente (64,3% com lesão única e 71,4% com lesão ≤ 60 dias), sendo mais relevante em nosso estudo o valor da metodologia proposta no diagnóstico da LTA.

Quanto ao monitoramento de cura pós-terapêutica específica na LTA, até o momento, não se observa um critério de cura efetivo parasitológico ou imunológico. O critério de cura considerado é apenas clínico, baseado na reepitelização das lesões. Os testes sorológicos convencionais são ainda considerados limitados, pois não distinguem a infecção ativa da infecção passada. A dinâmica da reatividade de anticorpos dirigidos contra antígenos de membrana após tratamento da LTA não está bem esclarecida (BRITO et al. 2001). A abordagem do monitoramento sorológico foi inicialmente descrita por Bittencourt et al. (1968), pelo teste de IFI, avaliando-se em diferentes

tempos 29 pacientes portadores de leishmaniose mucocutânea após o tratamento. Ao encontrarem resultados negativos em apenas seis amostras de soros nos pacientes tratados, sugeriram esse método como critério de cura. A pesquisa de anticorpos foi negativa em apenas dois pacientes, com seis e 12 meses após tratamento. Em quatro pacientes, o resultado foi duvidoso, ou seja, apresentou baixos títulos com três meses, e com quatro e 10 anos após tratamento. Sendo assim, ocorreu diminuição dos títulos de anticorpos após tratamento. Entretanto, o número de amostras de soros avaliadas foi pequeno para permitir conclusões mais seguras.

Desde então, outros estudos sugeriram a utilização da IFI como critério de cura (CHIARI et al., 1973; SOUZA et al., 1982; MENDONÇA et al., 1988; SCHUBACH et al., 1998). Embora tenha sido observada uma queda dos títulos antes e após tratamento nesses estudos, a maioria dos pacientes tratados apresentava títulos positivos pós-terapêutica, concordando com nossos resultados. Considerando a aplicabilidade como critério de cura pós-terapêutica da nova metodologia apresentada por nosso grupo, a partir da curva de titulação dos anticorpos, os pacientes foram acompanhados AT, um, dois e cinco anos PT, através da IFI e da citometria de fluxo. A opção pelo monitoramento sorológico um ano PT baseou-se no conhecimento de que mais de 90% das recidivas na LTA ocorrem até um ano após-tratamento (PASSOS et al., 2001). Isso garantiu maior autenticidade na representação do perfil sorológico do paciente tratado e curado. Com o monitoramento dois e cinco anos PT, buscamos a possibilidade de evidenciar uma maior curva de titulação de anticorpos após o tratamento; garantindo maior segurança da metodologia proposta.

Embora tenha sido observada uma queda significativa no percentual de positividade e nos títulos de anticorpos IgG no grupo 1, 2 e 5 anos - PT em relação ao grupo AT; 61,54% (8/13); 70% (7/10) e 50% (5/10), respectivamente, dos pacientes tratados ainda apresentaram títulos positivos para IFI 1, 2 e 5 anos após o término do tratamento. Ainda que autores tenham sugerido uma boa correlação entre a cura das lesões e a queda na titulação dos anticorpos circulantes por IFI (SCHUBACH et al., 1998), nossos dados sugerem que a pesquisa de anticorpos, pela IFI, não é suficiente para ser aplicada como um critério de cura na LTA. A manutenção da positividade de anticorpos de IgG pela IFI após o tratamento indicam possibilidade de recidiva das lesões cutâneas, risco de doença mucosa devido a persistência parasitária e que o

paciente permanece em área de transmissão ativa (SOUZA et al., 1982; MENDONÇA et al., 1988; MARZOCHI 1992; NETTO et al., 1990). Nesse contexto, nos estudos de acompanhamento de pacientes deve ser considerado a ocorrência de perdas de resultados. Isso dificulta a interpretação dos resultados, pois os pacientes geralmente residem em área endêmica, e, portanto, podem apresentar anticorpos séricos devido à exposição a picadas de insetos infectados. Embora tenha sido excluído de nosso estudo um paciente que apresentou recidiva na coleta 5 anos PT, acreditamos que o encontro de reatividade nos títulos de alguns pacientes tenha sido devido à permanência do indivíduo em área de transmissão ativa e/ou persistência parasitária.

Romero et al. (2005) descrevem uma queda dos níveis de reatividade de anticorpos IgG após tratamento específico, com melhor acurácia pela reação de ELISA, independente da cura (após 12 meses) ou falha terapêutica. De um modo geral, até o momento, o que parece é que a pesquisa de anticorpos através da utilização de metodologias convencionais empregando-se substrato antigênico de *Leishmania* ou antígenos solúveis do parasito. Embora promissora, não se aplica de forma definitiva como critério de cura na LTA. Esse fato estimula a busca por metodologias alternativas com preparações antigênicas e tecnologias mais adequadas para o monitoramento de cura pós-terapêutica na LTA.

O monitoramento de cura pós-terapêutica na LTA 1, 2 e 5 anos - PT, pela citometria de fluxo, mostrou que a citometria de fluxo teve um desempenho melhor em relação a IFI. Pois foi observada uma queda maior no percentual de positividade, sobretudo na mediana dos valores de PFP. A análise de amostras de soros individuais, empregando o ponto de corte de PFP=20%, demonstrou que 77% (10/13), 80% (8/10) e 70% (7/10) dos pacientes tratados 1, 2 e 5 anos, respectivamente, apresentaram PFP $\leq$ 20%, sugerindo a aplicabilidade no controle de cura pós-terapêutica na LTA. Sendo assim, o teste permitiu identificar a cura na maioria destes pacientes, ressaltando que para validação destes resultados um número maior de pacientes deve ser avaliado.

No presente estudo, o método sorológico de pesquisa de anticorpos IgG de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por citometria de fluxo, além de ter demonstrado ser uma alternativa para diagnóstico da LTA, também apresentou perspectivas para uso no monitoramento de cura pós- terapêutica. Embora considerado de elevado custo para

uso na rotina laboratorial, devido ao preço do equipamento, trata-se de um método de execução simples, rápido, de boa reprodutibilidade (FALDYNA et al., 2001). As células da amostra em suspensão são marcadas por anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos, que permitem a identificação e a quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência (ROITT et al., 1999), além disso isento de variabilidades metodológicas inerentes ao analista, com sensibilidade superior aos diferentes protocolos de detecção e revelação convencionais e menos invasivo para o paciente. E no que se refere aos reagentes utilizados, existe a possibilidade de se trabalhar minimizando os volumes de reagentes, com as chamadas microtécnicas, que favorecem com o menor custo final do teste (ROCHA et al., 2006).

Entretanto, atualmente, laboratórios clínicos têm investido na aquisição de um citômetro devido sua freqüente utilização para as mais diversas sub-áreas da ciências biológicas e da saúde (VIEIRA et al., 2003; NAKAGE et al., 2005; MACHADO-JÚNIOR et al., 2006; THOMAS; BUXBAUM et al., 2008; SANTIAGO et al., 2008). Assim, nesse contexto, a ampliação do uso da citometria de fluxo permitirá, num futuro próximo, a implementação de novas metodologias em laboratórios convencionais, favorecendo maior intercâmbio entre os centros de pesquisa de desenvolvimento tecnológico e a rotina de um laboratório clínico.

Sendo assim, esta nova metodologia sorológica que utiliza a citometria de fluxo na detecção de anticorpos antipromastigotas de *L. (V.) braziliensis*, demonstrou ser uma alternativa diagnóstica aplicada ao estudo da LTA e que as informações obtidas nesse estudo abrem perspectivas para o monitoramento de cura pós- terapêutica da LTA. Além disso, a elaboração de outros estudos nesta linha poderá contribuir no entendimento da resposta imune humoral em pacientes com LTA.

8 CONCLUSÕES

1. Baseado no perfil de anticorpos monoclonais e isoenzimas, o isolamento da *L. (V.) braziliensis* em cultura permitiu a confirmação de que esta é a única espécie responsável pela LTA em PE. Essa confirmação é importante para melhor compreensão dos aspectos clínicos e laboratoriais e, sobretudo para o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas.
2. A análise comparativa dos índices de desempenho demonstrou que citometria de fluxo foi superior a IFI. Indicando que a técnica é uma alternativa diagnóstica com aplicabilidade no estudo da LTA .
3. A maior sensibilidade e especificidade apresentadas pela técnica de citometria de fluxo garantiram confiabilidade ao comparar com a IFI. Demonstrando que a técnica foi eficaz na identificação de pacientes antes e após o tratamento quimioterápico.
4. Os valores de PPFP na região de baixa reatividade determinada na citometria de fluxo ($PPFP \leq 20\%$) foram apenas observados em pacientes com LTA com menos de 60 dias de evolução, mostrando que o tempo de incubação da doença pode interferir no desempenho do teste, resultando em falso-negativos.
5. Embora seja necessário validar o teste de citometria de fluxo com maior número de amostras de pacientes, a técnica permitiu identificar a cura na maioria dos pacientes comparada à IFI, proporcionando perspectivas para o monitoramento de cura pós-terapêutica da LTA através da citometria de fluxo.

9 PERSPECTIVAS

1. Identificar os pacientes com doença ativa e após cura clínica por tratamento quimioeterápico ou espontânea com ênfase na pesquisa de isotipos IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) anti-promastigotas vivas e fixadas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*;
2. Avaliar a aplicabilidade da pesquisa de isotipos IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4);
3. Associar a expressão dos isotipos de IgG acima citados com as manifestações clínicas dos pacientes avaliados;
4. Avaliar soros de pacientes portadores de outras condições clínicas, tais como: hanseníase, paracoccidioidomicose, tuberculose, toxoplasmose, malária, leishmaniose visceral-LV e doença de Chagas-DC.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFRIN, F.; ALI, N. Isotype profiles of *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice: preferential stimulation of IgG2a/b by liposome-associated promastigote antigens. **Journal of Parasitology**, v. 84, n.4, p.743-748, 1998.

AFRIN, F.; ALI, N. Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. **Infection and Immunity**, v. 65, n.6, p. 2371-2377, Jun, 1997.

AGUIAR-PUPO, J. Gaspar Vianna. **Anais Brasileiros de Dermatologia**.v. 37, n. 1, p. 36-37, 1962.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, 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. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, Jan/Fev, 2004.

AMATO,V. S. et al. An avaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and imunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 23-30, jan/Feb, 1998.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 35, p. 699-705, Jan, 2010.

ANAM, K., et al. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian kala-azar patients. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n.2, p. 231-235, Mar, 1999.

ANDRADE, M.S. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. Tese Mestrado. **Fundação Oswaldo Cruz**, Pernambuco, Brasil, 2004.

ANDRADE, B.B. et. al. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas Diagnostic Methods of Tegumentary Leishmaniasis: Facts, Fallacies and Perspectives. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 75-82, Jan/Jun, 2005.

ANDRADE, M.S. et al. New outbreak of American tegumentary leishmaniasis in a military training center in the Zona da Mata region, in the north of the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 594-596, Set-Out, 2009.

ÁVILA, S. C.G.P. D. et. al. Estudo retrospectivo dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana diagnosticados no laboratório de patologia do Hospital de Base da FAMERP nos anos de 1995-2000, com enfoque clínico e anatomopatológico. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v.11, n.2, Apr/Jun, 2004.

AZEVEDO, A.C.R., et al. *Lutzomyia migonei* naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 199, Apr/Jun., 1990a.

AZEVEDO, A.C.R. et al. Natural infection of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* by *Leishmania* of the *Braziliensis* complex in Baturité, Ceará State, Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 251, Apr/Jun., 1990b.

BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n.12, p. 6734-6740, Dec, 2002.

BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 production among patients with american cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 200, p. 75-78, May, 2009.

BARRIO, A. et al. Short Report: Use of kDNA-based Polymerase Chain Reaction as a Sensitive and Differentially Diagnostic Method of American Tegumentary Leishmaniasis in Disease-Endemic Areas of Northern Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p. 636-639, 2007.

BASANO, S.A.; CAMARGO L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328-337, Sep, 2004.

BENSOUSSAN, E., et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 1435–1439, Apr. 2006.

BITTENCOURT, A.L., et al. Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescência na leishmaniose tegumentar. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 10, n. 4, p. 247-252, Jul/Ago, 1968.

BLUM, J. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, p. 158–166, Jan, 2004.

BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.28, n.1, p.121-134, Jan. 1998.

BOURDOISEAU, G., et al. Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p. 71-78, 2009.

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**, London, v. 93, p. 488-494, Sep/Oct. 1999.

BRANDÃO-FILHO, S.P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 97, p.291-296, May/June, 2003.

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**, Rio de Janeiro, v. 88, p. 633-634, Oct. 1993.

BRITO, M.E.F. Desenvolvimento de um método diagnóstico para a leishmaniose tegumentar americana com base em Western blot de frações antigênicas de *Leishmania braziliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 3, p. 313-314, Mai/Jun, 1999.

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**, Washington, v. 7, n. 2, p. 318-321, Mar. 2000.

BRITO, M. E. F., 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, London, v. 95, p. 203-206, Mar/Apr. 2001.

BRITO, M. E. F., et al. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n.10, p. 2445-2448, Oct, 2008.

BUXBAUM, L.U. A detrimental role for IgG and FcγR in *Leishmania mexicana* infection, **Immunologic Research**, v. 42, p. 197-209, Nov, 2008.

CAMPBELL-LENDRUM, D .H. et al. Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 13, p. 299, Jan., 1999.

CARRIER, Y. et al. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-β T cell-transgenic mice. **Journal of Immunology**, New York, v. 178, n. 1, p. 179-85, 2007.

CARVALHO, S.H. Avaliação da toxicidade da N-metilglucamina no tratamento da leishmaniose tegumentar americana em serviço público de referência de Minas Gerais. Tese Mestrado. **Universidade Federal de Minas Gerais**, Minas Gerais, Brasil, 2007.

CARVALHO NETA, A.V. et al. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e zootecologia**, v. 58, n. 4, p. 480-488, 2006.

CASTILHO, T.M.et al. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 540-546, 2003.

CHARGUI, N. et al. et al. Usefulness of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p. 762—768, 2005.

CHATTERJEE, M., et al. Distribution of IgG subclasses in antimonial unresponsive Indian kala-azar patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v.114, n.3, p. 408-413, 1998.

CHIARI, C.A., et al. Pesquisa de anticorpos, por imunofluorescência, em soros de pacientes com Leishmaniose tegumentar americana apresentando lesões cutâneas recentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 15, n.5, p.304-309, 1973a.

CHIARI, C.A. et al. Reação de Imunofluorescência indireta no controle de tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 15, n. 5, p. 298-303, 1973b.

DE BRUIJIN, M.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, Cambridge, v. 52, p. 45-58, Set., 1992.

DA COSTA, C.A. et al. Montenegro Skin Test - Evaluation of the Composition and Stability of the Antigen Preparation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 193-194, Jan, 1996.

DEDET, J.P. et al. The Parasite. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 261-268, 1999.

DE QUEIROZ, R. et al. Cutaneous leishmaniasis in Ceará State in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.50, p. 693-698, 1994.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Exeter, v. 27, p. 305-318, Sep. 2004.

FALDYNA, M. et al. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.82, n.1-2, p.23-37, 2001.

FAGUNDES, A. et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 109-112, Fev, 2010.

FRANÇA F. et al. An outbreak of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p.169-174, Apr-Jun, 1991.

FNS/FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 5ª ed., Ed. Brasília/DF, 2000.

GARCIA, F.C.B. et al. Subsidiary methods for the diagnosis of American tegumentar leishmaniasis (ATL): comparison of sequencing of DNA and PCR-RFLP for identification of leishmania species in skin samples. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n.3, p. 339-344, 2005.

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. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n.3, p. 747-750, Mar, 1991.

GALATI, E.A.B. et al. Estudo dos flebotomíneos (Díptera : Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, p. 115-128, 1996.

GAZOZAI, S.U. et al. Comparison of diagnostic methods in cutaneous leishmaniasis (histopathology compared to skin smears). **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 4, p. 363-366, Oct, 2010.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, L. A., GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**, 10ª ed. , São Paulo, Atheneu, cap.8, p.36-53, 2000.

GOMES, M. L. et al. Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 60, 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 Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, n. 1, p. 91-102, 2002.

GONTIJO, C.M.F. et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, v. 81, p. 143-150, 2002.

GONTIJO, B. CARVALHO M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, p.71-80, Jan./ Fev., 2003.

GONZALES, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Issue 2. Art. No.: CD004834. DOI:10.1002/14651858.CD004834.pub2, 2009.

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

GRIMALDI, G.JR. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 77, n.2, p.195-215, 1982.

GRIMALDI, G.JR., TESH, R. B. – Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.6, n. 3, p. 230-250, Jul. 1993.

HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 25, p. 363-370, 2000.

HEPBURN, NC. Management of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, p. 151–154, 2001.

HOLZMULLER, P., et al. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, London, v. 132, p. S19-S32, 2006.

HUSSAIN, R, et al. Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies are markers of progressive disease in leprosy. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 2, p. 410-415, Feb, 1995.

JACOBSON, R.L. et al. Leishmaniasis in an Era of Conflict in the Middle East. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 00, p. 1-12, 2010.

JONES, T.C. et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. **Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 156, p. 73-83, Jul., 1987.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.

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

KITANI, A.; STROBER, W. Regulation of C γ subclass germline transcripts in human peripheral blood B cells. **Journal of Immunology**, v. 151, p. 3478, 1993.

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

LAINSON, R.; SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. Lumsden WHR and Evans D. **Biology of the kinetoplastida**, Academic Press, London, v. 1, p. 1-120, 1979.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W & Killick Kendrick R Ed. **The leishmaniasis in Biology and Medicine**, Academic Press, London, v.1, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R., SHAW, J.J. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to **Amazonian Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 44, p. 94-106, 1992.

LAINSON, R.; SHAW J.J. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In Collier L, Balows A & Sussman M (Eds). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases**, 9nd Ed., Arnold, London, v. 5, p. 241-266, 1998.

LIEW, F.; O'DONNELL, C.A. Immunology of leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 32, p. 161-259, 1993.

LIMA, H. C., et al. Resolution of an infection with *Leishmania braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *Leishmania major* in BALB/c mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94 p. 71-76, 1999.

LIMONCU, M.E. et al. A new experimental *in vitro* culture medium for cultivation of *Leishmania* species. **Journal of clinical Microbiology**, v. 35, p. 2430-2431, 1997.

MACHADO, P. E. 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, 2004.

MACHADO- JÚNIOR, J.C. et al. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p. 645-655, Dez, 2006.

MARCONDES, M. et al. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, doi:10.1016/j.vetpar.2010.09.036, Sep, 2010.

MARSDEN, P. D. Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p.485-487, Jul./Set., 1994.

MARTÍN-RABADÁN, P. et al. El laboratorio de microbiología ante las enfermedades parasitarias importadas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, doi:10.1016/j.eimc.2010.03.013, Mar, 2010.

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. The detection of *Leishmania braziliensis* DNA in American tegumentary leishmaniasis patients. **Revista de Saúde Pública**, v.44, n. 3, p. 1-4, 2010.

MARZOCHI, M.C., et al. Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados obtidos em 1974 e 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 22, n. 3, p. 149-155, Mai/Jun, 1980.

MARZOCHI, M. C. A. – Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 63, n.5, p. 82-104, 1992.

MAYRINK, W., et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 14-21, Jan/Feb. 2006.

MENDONÇA, S.C.F. et al. Indirect immunofluorescence test in new world leishmaniasis: serological and clinical relationship. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 3, p. 347-55, 1988.

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**, Chicago, v. 189, n. 6, p. 1018-1023, Mar. 2004.

MS/MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Controle da Leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília, 2007.

MOHAMMADI, M. R., et al. Identification of novel *Leishmania major* antigens that elicit IgG2a response in resistant and susceptible mice. **Korean Journal of Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 43-48, 2006.

MOLESLEH, I.M., et al. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in Jordan using indirect antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. **Acta Tropica**, v. 59, n.2, p. 163-172, 1995.

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

MUKBEL, R., et al. Soluble factors from *Leishmania* major-specific CD4⁺T cells and B cells limit *L. amazonensis* amastigote survival within infected macrophages. **Microbes and infection**, v. 8, p. 2547-2555, 2006.

NASEREDDIN, A.; JAFFE, C.L. Rapid Diagnosis of Old World Leishmaniasis by High-Resolution Melting Analysis of the 7SL RNA Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2240-2242, Jun, 2010.

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

NETTO, E.M. et al. Long-term follow-up of patients with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection and treated with Glucantime. **Transactions of The Royal Medicine Hygiene**, v. 84, n.3, p. 367-70, Mai-Jun, 1990.

O'NEIL CE, et al. *Leishmania (Viannia) panamensis* – specific IgE and IgA antibodies relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 49: 181-188, 1993.

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. 38-49, Jan, 1996.

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

PASSOS, V. M. A., 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.

PASSOS, V.M.A et al. Leishmaniose tegumentar na Região Metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1989-1995). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 5-12, Jan-Fev, 2001.

PERINOTO, A.C. et al. Biosensors for Efficient Diagnosis of Leishmaniasis: Innovations in Bioanalytics for a Neglected Disease. **American Chemical Society**, 10.1021/ac101920t, 2010.

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

PIRMEZ, C. et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1819-1823, Jun, 1999.

PISSINATI, 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, p. 193-202, 2008.

RAMOS, A., et al. Detection and identification of human pathogenic *Leishmania* and *Trypanosoma* species by hybridization of PCR-amplified mini-exon repeats. **Experimental Parasitology**, v. 82, p. 242-250, 1996.

READY, P. D.; RIBEIRO, A. L. Presence of *Psychodopygus welcomei*: a proven vector of *Leishmania braziliensis* in Ceará State. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.78, p. 235-236, Apr/Jun., 1983.

READY, P.D. Leishmaniasis emergence in Europe. **Euro Surveill**, v. 15, n. 10, pii=19505. Available online: <http://www.eurosurveillance>, Mar, 2010.

REIS, L. C., et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 103-115, Maio/Ago. 2006.

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

REIS, L.C et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 439-443, Set-Out, 2008.

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**, Hoboken, v. 23, p. 63-69, 2009.

REITHINGER, R., et al. Cutaneous leishmaniasis. In: <http://infection.thelancet.com>, v. 7, Sep., 2007.

REITHINGER, R.; MOHSEN, M.; LESLIE, T. Risk Factors for Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis at the Household Level in Kabul, Afghanistan. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, doi:10.1371/journal.pntd.0000639, Mar, 2010.

RIBEIRO, C. F., et al. Use of ELISA employing *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.148, p. 200-206, 2007.

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

RODRIGUES, E. H. G. et al. Evalution of PCR for diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of endemicity in Northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 3572-3576, Oct., 2002.

RODRIGUES, A. M., et al. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de melgumina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 139-145, Mar/Apr. 2006.

RODRIGUEZ, N., et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.9, p. 2246-2252, 1994.

RODRIGUEZ, V., et al. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. **Parasity Immunology**, v. 18, n.7, p. 341-345, 1996.

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

ROGERS, K. A., et al. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 209, n. 1, p. 1-7, Mar. 2002.

ROITT, I. et al. **Imunologia**. São Paulo: Manole, p. 424, 1999.

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.

ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. Elementos de epidemiologia epidemiológica. In: _____. **Epidemiologia & Saúde**. 6a ed. Rio de Janeiro: MEDSI, p.149-177, 2003.

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

ROCHA, R. D. 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 and International Health**, Oxford, v.11, n. 2, p. 156-166, Feb. 2006.

RYAN, J.R., et al. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 1037-1043, Mar, 2002.

SALMAN, S.M.; RUBEIZ, N. G. & KIBBI, A. G. Cutaneous Leishmaniasis: Clinical Features and Diagnosis. **Clinics in Dermatology**, New York, NY, v.17, p. 291-296, 1999.

SAMPAIO, R.N.R. et al. Study on the transmission of American cutaneous leishmaniasis in the Federal District. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 686-690, Nov-Dez, 2009.

SANTIAGO, M.A. et al. Differentiation between canine cutaneous and visceral leishmaniasis by the detection of immunoglobulin G specific for *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens using flow cytometry. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 341–346, 2008.

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.

SCHALLING, H.D.F.H.; OSKAM, L. Review: Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine and International Health**, v., n. 8, p. 641–65, 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, Sep. 1998.

SHAW, J.J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from

cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 3, p. 323-335, 1975.

SILVEIRA, T.G.V. et al. Observations on laboratory diagnosis and cutaneous leishmaniasis epidemiology in the State of Paraná, South of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 413-423, Jul-Ago, 1999.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, v.27, p.1135-1145, 1997.

SKEIKY, Y. A., 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.

SOUZA, W.J.S. et al. Utilização da reação de imunofluorescência indireta no acompanhamento da terapêutica da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 77, n. 3, p. 247-253, Jul-Set, 1982.

SOUZA, M. A. et al. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 137-141, Mar/Apr. 2005.

SOTO, J. et al. Comparison of Generic to Branded Pentavalent Antimony for Treatment of New World Cutaneous Leishmaniasis. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p. 577–581, 2004.

STAVNEZER, J.; KANG, J. The Surprising Discovery That TGF β Specifically Induces the IgA Class Switch. **Journal of Immunology**, v.182, p.5-7, Jan., 2009.

STENGER, S.; RÖLLINGHOFF, M. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 60, p. 43-46, 2001.

SZARGIKI, R. et al. Comparison of Serological and Parasitological Methods for Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis in the State of Paraná, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47-52, 2009.

TAVARES, C.A., et al. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v.3, n. 5, p. 657-667, 2003.

THOMAS, B.N.; BUXBAUM, L.U. Fc_γRIII Mediates Immunoglobulin G-Induced Interleukin-10 and Is Required for Chronic *Leishmania mexicana* Lesions. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 2, p. 623-631, Feb. 2008.

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**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 203-209, Dec. 1999.

UCHÔA, C.M.A. *et al.* Serological and epidemiological aspects of canine american tegumentary leishmaniasis from Maricá, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 563-568, Nov-Dez, 2001.

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 Experimental Immunology**, v. 100, p. 54-58, 1995.

VARGAS-DUARTE, J.J. *et al.* Western blot, ELISA and indirect immunofluorescence test evaluation of *Leishmania (Leishmania) infantum*-infected dogs. **Revista de Salud Pública**, v. 11, n. 4, p. 641-652, Jul, 2009.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Hagerstown, v. 16, n. 2, p. 97-101, Apr. 2003.

VENAZZI, E.A.S. *et al.* Polymerase chain reaction with lesion scrapping for the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 427-430, Jun, 2006.

VEXENAT *et al.* Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar Americana em uma região endêmica do estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, p. 293-301, Jul./Set., 1986.

VEXENAT, A.C., *et al.* Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 38, n.3, p177-185, Mai/Jun, 1996.

VIANA, G.M.C. *et al.* Anti-*Leishmania* titers and positive skin tests in patients cured of kala-azar. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research Online Provisional Version**, www.bjournal.com.br, Nov, 2010.

VIEIRA, L.M. et al. Flow cytometric assay optimization for peripheral blood monocyte tissue factor analysis. **Revista brasileira Hematologia Hemoterapia**, v. 25, n. 3, p. 141-147, Sep, 2003.

WEIGLE, K.A., et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colômbia: a comparison of seven methods. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36, n. 3, p. 489-496, 1987.

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.

WEINER, H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. **Immunological Reviews**, Malden, v. 182, p. 207-214, 2001.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Geographical distribution. 2003. Disponível em: <[www.WORLD HEALTH ORGANIZATION.int/emc/diseases/leish/leishgeo1.html](http://www.WORLDHEALTHORGANIZATION.int/emc/diseases/leish/leishgeo1.html)>. Acesso em janeiro de 2010.

11 ANEXOS

ANEXO 1



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



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>.

ANEXO 2



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

**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 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>.

ANEXO 3



Centro de Pesquisas

AGGEU MAGALHÃES

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



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 assinie 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>.

ANEXO 4 – ARTIGO SUBMETIDO

Flow cytometry application in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G

Andresa Pereira de Oliveira^{1*}, Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro¹, Amanda Ferreira de Almeida¹, Marina de Assis Souza¹, Luiza Campos Reis², Hiro Goto², Maria Edileuza Felinto de Brito¹, Beatriz Julieta Celeste², Olindo Assis Martins-Filho³, Valéria Rêgo Alves Pereira¹.

¹Aggeu Magalhães Research Center, FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brazil; ²University of São Paulo, Institute of Tropical Medicine, São Paulo, Brazil; ³ René Rachou Research Center, FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the techniques of indirect immunofluorescence assay (IFA) and flow cytometry to clinical and laboratory evaluation of patients before and after clinical cure and to evaluate the applicability of flow cytometry in post-therapeutic monitoring of patients. Sera from 14 patients before treatment (BT), 13 patients 1 year after treatment (AT), 10 patients 2 and 5 years AT were evaluated. The results from flow cytometry were expressed as levels of IgG reactivity, based on the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP). The 1:256 samples dilutions allowed to differ between individuals BT and AT. Comparative analysis of IFA and flow cytometry by ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) showed, respectively, AUC (area under curve) = 0.8 (95% CI = 0.64-0.89) and AUC = 0.90 (95% CI = 0.75-0.95), demonstrating that the flow cytometry has a higher accuracy. Our data demonstrated that 20% was the best cut off point identified by the ROC curve for the flow cytometry assay. This test showed a sensitivity of 86% and specificity of 77% while the IFA had a sensitivity of 78% and specificity of 85%. The after treatment screening, through comparative analysis of the techniques performance indexes, 1, 2 and 5 years AT, showed a better flow cytometry performance comparing to IFA. Therefore,

flow cytometry showed to be a better diagnostic alternative when applied to the study of ATL and the information obtained in this work opens perspectives to monitor cure after treatment of ATL.

1 INTRODUCTION

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is an infection caused by several species of unicellular protozoa of the genus *Leishmania* (Basano; Camargo, 2004). The ATL has an increased incidence in Pernambuco, State in the Northeast region of Brazil, where we can highlight the Zona da Mata region, with more than 60% of the total reported cases (Brandão-Filho et al. 1999; Brito et al., 2008). The increasing incidence and transmission persistence in Brazil revealed that ATL is an important public health problem, where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the principal responsible species and circulating in Pernambuco (Brito et al., 2008, Andrade et al., 2009).

So far the cure criterion is based on clinical cure, seen by the complete reepithelization of skin wound ulcerated or not, and by the total regression of the infiltration and erythema, observed usually three months after treatment in the cutaneous form (Gontijo; Carvalho, 2003; Mayrink et al. 2006). Several approaches have been suggested as cure criterion after treatment of ATL. However, assuming that the humoral immune response may play a modulator role on the cellular response during infection, Bitterncourt et al (1968), suggested the possibility to research antibodies as a way to monitor ATL cure. The dynamics of antibody production after treatment is still not fully known, and the levels of antibodies against specific antigens remain undefined (ROMERO et al., 2005). The problem can be attributed to lack of a standard antigenic preparation to detect specific antibodies.

Although antibodies high titers can be found in all clinical manifestations of ATL, is generally accepted that the protective immune response in *Leishmania* infection is primarily cellular, demoting the antibodies participation to background (Liew, O'Donnell, 1993). Studies related to the analysis of humoral immune response in ATL have approached the role of immunoglobulins in immunopathologic mechanisms involved in resistance and / or pathogenesis of infection. In addition, also evaluate the use of serological investigations in the diagnosis and monitoring of post-treatment efficacy (O'Neil et al. 1993; Molesleh et al. 1995; Chiari et al., 1973). Researches show that all anti-*Leishmania* specific antibodies isotypes, except IgD, are detected in the

serum of patients with ATL. The detection frequency of IgG subclasses in ATL, according to Pissinate et al. (2008), is $IgG1 > IgG3 > IgG2 = IgG4$. Patients with a longer disease evolution time show high levels of IgE, while IgA levels are increased in patients with the mucocutaneous form (O'Neil et al., 1993). The intensity of the humoral response seems to be related to parasite load and chronicity of the infection, and high antibody titers can be observed in all clinical manifestations of ATL (Trujillo et al., 1999). Available studies with immunoserologic methods for antibodies research in ATL are controversial, due to its low sensitivity and specificity (Bourdoiseau et al. 2009; Mukbel et al., 2006).

Since there isn't a diagnostic test considered the gold standard for ATL, diagnosis is done by the association of clinical, epidemiological and laboratory aspects (Brito et al., 2008, Kar, 1995). The clinical diagnosis is not always easy or immediate, because ATL injuries are often associated with lesions of other diseases, as cromomycosis, sporotrichosis, some types of cancer, paracoccidioidomycosis, syphilis, cutaneous tuberculosis and lepromatous leprosy (Gontijo; Carvalho, 2003; Marzochi 1992). Moreover, there are limitations in conventional diagnostic methods. The indirect immunofluorescence assay (IFA) and enzyme immunoassay - ELISA, conventional serological tests that are more widely used, do not correlate the levels of circulating antibodies with the stage of the disease, and may have cross reactions with other trypanosomatids (Kar, 1995; Vexenat et al., 1996). Due the limitations of these techniques, alternative immunological approaches have been employed.

One of them is the flow cytometry, a technology that simultaneously measures and analyzes various physical characteristics of individual particles, as the fluid flow passes through a light beam, thereby allowing the detection of anti- *Leishmania* antibody (Rocha et al. , 2002, 2006). Considering the applicability of flow cytometry, Rocha et al. (2002), used a system free from methodological variability inherent in the analyst and with superior applicability to different protocols of conventional detection and revelation. Therefore, they brought an alternative by testing IgG antibodies of anti-live *Leishmania (V.) braziliensis*, applicable to the diagnosis and post-therapeutic criteria of cure for ATL. Regarding the applicability of flow cytometry, as described by Martins-Filho et al. (1995), as a methodology with superior sensitivity to the different protocols proposed for conventional detection, this study sought a better understanding of the humoral immune response linked to clinical progression of ATL patients. It aimed as

well to provide subsidies for the use of the flow cytometry technique as an effective diagnosis method and to assess its applicability in monitoring post-therapeutic cure of ATL. Thus, the indirect immunofluorescence assay (IFA) and flow cytometry were compared in clinical and laboratory evaluation of patients before and after clinical cure and the applicability of flow cytometry was evaluated for post-therapeutic monitoring of these patients.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 PATIENTS

A total of 14 patients with active localized cutaneous leishmaniasis from endemic areas of the State of Pernambuco were evaluated on clinical, epidemiological features and laboratorial criteria. All patients showed positive diagnosis for ATL, such as: direct research, Montenegro skin test, indirect immunofluorescence and PCR. Treatment of patients was carried out with N-methyl glucamine antimoniate (Glucantime®) and the therapeutic scheme was made of doses of 20 mg/Kg/day through subcutaneous injections during twenty or thirty days. The cure criterion was clinical, with the total healing of lesions and re-epithelization of the skin. Sera samples were collected before chemotherapy (n=14) and in different years after treatment: 1 year (n = 13), 2 years (n= 10) and 5 years (n=10). Eight control sera were taken from healthy blood donor volunteers. All of them signed the “Term of Free and Informed Consent” and CPqAM / Fiocruz Research Ethics Committee (Protocol no 27/04) approved the experimental protocols.

2.2 PARASITE PREPARATION

Leishmania (Viannia) braziliensis promastigotes (MHOM/BR/75/M2903) maintained *in vitro* in the Immunogenetics laboratory / CPqAM / FIOCRUZ / PE, were expanded in Schneider's medium until the exponential phase. Then the parasites were subjected to low-rotation (7 X g), 25 °C for 10 minutes. Then the parasites were recovered from the supernatant after 10 min rest at room temperature. The supernatant was transferred to another tube and the pellet discarded. The parasites were washed in buffer pH 7.2, containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (PBS-10% FBS) three times at 4 °C, 871 X g for 10 min. The sediment formed was thoroughly homogenized. The

parasites were then resuspended for fixing, in an equal volume of 1% paraformaldehyde, and incubated overnight. Then they were washed with buffered saline containing 10% FBS. Aliquot of parasite suspension was counted and the concentration adjusted for the flow cytometry test.

2.3 INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE REACTION

The IFA test was performed in collaboration with the Seroepidemiology and Immunobiology laboratory of the Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo. The slides, containing the antigenic suspension of fixed promastigotes of *Leishmania* (*L. major*-like promastigotes / MHOM/BR/71/49) were coated with 20 µl of serum samples diluted in the ratio of 1:20 to 1:320 in 0.01 M PBS, pH 7.2. Two standard sera were added (positive and negative), and incubated in a moist chamber for 30 minutes at 37 °C. After incubation, the excess sera was removed from slides, washing them by immersion in PBS, pH 7.2 three times at intervals of 10 minutes. The slides were dried on paper towel in a dilution ratio of 1:100 of anti-human IgG (heavy chain specific) conjugated to fluorescein isothiocyanate-FITC (Biolab Mérieux) prepared in Evans blue (40 mg) in buffer solution PBS (diluted at 1:10 ratio in the same buffer) was placed on slides, incubating with same conditions. After the reaction, the slides were washed three times in PBS for 10 min and dry with paper towels. The assembly was done with buffered glycerine pH 8.5 and then the slide was observed in the fluorescence microscope, with the objective of 250 X.

2.4 FLOW CYTOMETRY AND DATA ANALYSIS

The flow cytometry assay for the detection of *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* antipromastigotes was performed according to Rocha et al. (2002). Parasite suspension (2.5×10^5 /well) was incubated in 96-well U-bottom plates at 37°C for 30 min in the presence of different dilutions of inactivated serum samples (1:64 to 1:8192). Parasites were washed twice with 150 µl of PBS-10% FBS (1000 X g for 10 min at 4 °C). Then the parasites were incubated at 37° C for 30 minutes protected from light in the presence of anti-human IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate-FITC (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) diluted 1:400 in PBS -10% FBS. After the second washing, FITC labeled parasites were fixed for 30 minutes before being analyzed in flow cytometer (FACScalibur, Becton Dickinson) and identified using the software “Cell Quest Pro”

linked to the cytometer. The readings of the samples in the flow cytometer were performed within a maximum period of 24 hours after fixation of the parasites. Stained parasites were run in the cytometer, and 10.000 events per sample were acquired. Promastigotes were identified based on their specific forward (FSC) and side (SSC) light scattering properties. Following FSC and SSC gain adjustments, parasites were found by assuming a characteristic FSC X SSC dot plot distribution. The relative FITC fluorescence intensity of each event was analyzed with a single histogram representation. A marker was set up on the histogram representation of the FITC-conjugated internal control and used in all data analysis reported here to determine, for each sample, the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP) as previously described by Rocha *et al.* (2002).

2.5 CUT OFF AND Receiver Operating Characteristic Curve (ROC Curve)

For the IFA test, results were considered positive, when values were equal to or greater than the titer of 1:20. For flow cytometry, we used the cut-off suggested by Martins-Filho (1995), in order to analyze the test reactivity, where PPFP > 20% were considered positive for the test. The ROC curve was used to select the cut-off value to discriminate between positive and negative results of IFA and flow cytometry.

3 RESULTS

3.1 STUDY POPULATION SCREENING

Most patients had ulcerated lesions with raised borders and granulomatous background distributed in uncovered areas of the body. Only one patient presented the disseminated cutaneous form, with more than 20 papular lesions, distributed throughout the body surface. And another patient had the mucocutaneous form. The laboratory diagnosis of ATL was confirmed in collaboration with the CPqAM Leishmaniasis Reference Service and with Seroepidemiology and Immunobiology Laboratory (IMT / USP). Patients were included only after a positive diagnosis in at least one of the tests (Table 1).

3.2 APPLICABILITY OF INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE AND FLOW

CYTOMETRY TESTS IN THE IDENTIFICATION OF PRESENCE OR ABSENCE OF ATL IN PATIENTS

Patients who showed titers from 1:20 were considered positive by IFA, according to the methodology established in the Seroepidemiology and Immunobiology Laboratory (IMT / USP). We evaluated the applicability of the IFA method to identify clinical activity in ATL by total IgG reactivity of sera from individuals (Figure 1) in terms of sensitivity and specificity. These patients were classified according to the presence of ATL (BT- before treatment) and the absence of ATL (1, 2 and 5 years after treatment – AT). Patients analyzed showed a sensitivity of 92.86% and specificity of 38.46% in patients 1 year AT; specificity of 30% in patients 2 years AT and specificity of 50% in patients 5 years AT for the IFA test. For flow cytometry, we used a cut-off of 20% PPFP, as proposed by Martins-Filho (1995). The reactivity was expressed as the mean of the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP) sera (Figure 2), obtained after incubation of sera at dilutions of 1:64 to 1:8192, with fixed promastigotes under previously standardized conditions. The analysis of titration curves of IgG antibodies anti-live promastigotes of *L. (V.) braziliensis* present in patients' sera, suggested that the 1:256 dilution is the region (R) of reactivity that corresponds to the best titer of the differential reaction between BT individuals and 1, 2 and 5 years AT. This dilution of individual serum samples BT and AT were analyzed to evaluate its applicability in identifying patients clinical activity for ATL (Figure 3). The patients showed a sensitivity of 86% and specificity of 77% in patients 1 year AT; specificity of 80% in patients 2 years AT and specificity of 70% in patients 5 years AT for the flow cytometry test.

3.3 GLOBAL ACCURACY OF INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE AND FLOW CYTOMETRY TESTS

The results values of IFA titers and flow cytometry in serum dilutions of 1:256, were used to construct the ROC curve for the tests (Figure 4). With the ROC analysis, we found that the Area Under Curve IFA (AUC = 0.8; 95% CI = 0.78 to 0.99) differed from that observed for the test flow cytometry (AUC = 0.9; 95% CI = 0.75 to 0.99). Thus, we obtained an accuracy for the IFA test lower than the flow cytometry. Furthermore, the ROC curve showed that a cut-off of 20% of PPFP with sensitivity of 86% and specificity of 77% is better to demonstrate the performance of the test using flow

cytometry. This result is in agreement with the cut-off of 20% previously described by Martins-Filho et al. (1995). In relation to the cut-off point used for IFA, the ROC curve showed that with 1:20 titer it was seen a 78% sensitivity and a specificity of 85%, demonstrating that the test had low sensitivity when compared with flow cytometry.

4 DISCUSSION

Leishmania (V.) braziliensis is the main species responsible for the disease in Brazil, classified as a species of great importance to public health. It is responsible for a wide spectrum of lesions, which makes the clinical diagnosis neither simple or immediate. Moreover, their lesions are often confused with other skin infections, reinforcing the need for a differential diagnosis (Marzochi 1992; Pirmez et al. 1999; Avila et al., 2004). Thus, the socio-economic challenges associated with methodological difficulties in establishing a safe diagnosis of ATL, justifies the development of new diagnostic approaches for the disease, in search of a method of greater sensibility and specificity, especially in Brazil, where it's observed a spatial expansion of ATL.

The performance evaluation of individual samples by flow cytometry, at the cutoff point of 20%, as proposed by Martins-Filho et al. (1995), demonstrated the segregation of BT patients and individuals in different regions of AT, which had not been possible through the analysis of the titers of IFA. We decided to do a comparative analysis of test performance with the proposed technique IFA, the most conventional serological technique used for detection of antibodies indicated in the diagnosis of ATL by *Leishmania (V.) braziliensis*. Although, in some situations, the IFA serological results present difficulty finding parasites (Sampaio et al. 2009; Molesleh et al., 1995).

In a comparative analysis of the performance indices, the sensitivity values found for the IFA and flow cytometry demonstrated that flow cytometry is better applied to screening of ATL in epidemiological studies or as part of initial research in a patient, since it was frequently positive (12/14) in the presence of the disease. The sensitivity found for IFA agrees with other studies (Reis et al., 2008, Romero et al. 2005; Szargiki et al., 2009). Despite the relatively high sensitivity, studies report that the sensitivity of IFA for the cutaneous forms of *L. (V.) braziliensis* may present variation from 50 to 80% (Marzochi, 1992; Tavares et al., 2003). Studies show that the sensitivity of a diagnostic method depends on the multifactorial aspects inherent in the antigen nature used as well the detection system intrinsic to a particular technology (Kar 1995, Romero

et al., 2005). Thus, the best performance and reliability of the flow cytometry methodology in relation to IFA has been guaranteed by using intact parasites, selectively studying membrane antigens, available on the parasites of *L. (V.) braziliensis*. Thus, it was assured more sensitivity and specificity in the diagnosis of patients with ATL.

Regarding specificity, the data analysis showed that the flow cytometry is better when compared to the IFA, although it had an average performance and below desired levels. Gontijo et al. (2002) reported a reactivity of 21.5% for IFA in individuals without clinical signs of ATL, endemic areas residents for the disease. Therefore, we attributed the false-positive results in flow cytometry to the possibility of re-infection, since those individuals are from endemic areas and immunologically sensitized (Rocha et al., 2006).

Comparing the performance indices of both tests, IFA and flow cytometry showed that the flow cytometry presents a better performance than the conventionally used test. Carvalho Neta, et al. (2006) described the use of flow cytometry in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. From the cut-off of 20% PPFP it was possible to differentiate the reactive and nonreactive population for visceral leishmaniasis, with 96% sensitivity and 100% specificity. The study showed that the serological studies based on flow cytometry is a field with great potential for growth due to increased detection sensitivity compared to IFA, agreeing also with Martins-Filho et al. (1995).

In the ROC curve, the comparative analysis of the overall accuracy of the IFA and flow cytometry demonstrated a high accuracy for flow cytometry in relation to IFA. The ROC curve also allowed the identification and selection of a best cut-off point for the flow cytometry (Figure 5). Thus, through the ROC curve, the value of PPFP = 20% were in their best cut-off, giving better counterbalance sensitivity and specificity, it was observed that the cut off previously proposed by Martins-Filho et al (1995) can also be used to identify cases of ATL by flow cytometry in the study population using the parasite species *L. (V.) braziliensis*.

The cure criterion found so far only clinically, is based on the re-epithelialization of lesions. The conventional serological tests are still considered limited, because they do not distinguish active infection from past infection. The dynamics of the reactivity of antibodies directed against membrane antigens after treatment of ATL remains unclear (Brito et al. 2001). A few years ago, studies suggest the use of IFA as a cure criterion

(Chiari et al. 1973; Souza et al. 1982; Mendonça et al. 1988; Schubach et al., 1998). Although in these studies it has been observed a decline in titers before and after treatment, most patients had positive titers post-treatment. Considering the applicability of flow cytometry as a post-treatment cure criteria, from the antibody titration curve, we conducted the follow-up of BT patients, one, two and five years AT. A comparison was done between flow cytometry and IFA. Even though observing a significant drop in the percentage of positivity and IgG antibody titers in groups 1, 2 and 5 years AT related to the BT group, they still showed positive titers for IFA after the treatment. Although authors have suggested a good correlation between the lesions healing and the decrease in circulating antibody titers by IFA (Schubach et al., 1998), our data suggest that the search of antibodies by IFA is not enough to be applied as a cure criterion in ATL. The maintenance of positive IgG antibodies by IFA after treatment indicate the possibility of recurrence of skin lesions, mucosal disease risk due to parasite persistence and that the patient remains in an area of active transmission (Souza et al. 1982; Mendonca et al. 1988; Marzochi 1992; Netto et al., 1990).

In this work recurrence was observed in one patient in the five years after treatment group, although he has been excluded from the study, we believe that the reactivity against the titers of some patients was due to the permanence of the individual in an area of active transmission and or parasite persistence. The post-therapeutic healing monitoring in ATL 1, 2 and 5 years AT, by flow cytometry showed a better performance compared to IFI. We observed a greater decrease in the percentage of positive and above the median values PPFP. Analysis of individual serum samples, using a cut-off of PPFP = 20%, showed that patients 1, 2 and 5 years respectively, showed PPFP $\leq$ 20%, suggesting the applicability in the post-therapeutic cure control in ATL. Thus, the test identified a cure in most patients, noting that to validate these results a larger number of patients should be evaluated.

Many clinical laboratories have invested in the acquisition of a flow cytometer due its frequent use for many different sub-areas of biology sciences and health (Vieira et al. 2003; Nakage et al. 2005; Machado Jr et al. , 2006; Thomas, Buxbaum et al., 2008; Santiago et al., 2008). Thus, in this context, the expansion of the use of flow cytometry will, in the near future, aid the implementation of new methodologies in conventional laboratories, providing greater exchange between the research centers of technological development and the clinical laboratory routine. This new serologic methodology,

which uses flow cytometry to detect anti-*L. (V.) braziliensis*, has proved to be an alternative diagnostic applied to the study of ATL and that the information obtained in this study opens the possibility to monitor the after treatment cure of ATL. Furthermore, the preparation of other studies in this line would contribute to the understanding of the humoral immune response in patients with ATL.

5 REFERENCES

1. Andrade, MS, Brito, MEF, Silva, ST, Ishikawa, E, Carvalho, SMS, Brandão-Filho, SP 2009. New outbreak of American tegumentary leishmaniasis in a military training center in the Zona da Mata region, in the north of the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.* 42, 594-596.
2. Ávila, SCGPD, Silva, J, Medola, BO, Shibukawa, RH. 2004. Retrospective study of American Cutaneous Leishmaniasis cases diagnosed in the Pathology Laboratory of Hospital de Base-FAMERP: a clinical and anatomopathological focus. *Arq Ciênc Saúde.* 11, 1-5.
3. Basano, SA, Camargo, LMA 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol.* 7, 328-337.
4. Bittencourt, AL, Sodré, A, Andrade, ZA 1968. Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescência na leishmaniose tegumentar. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 10, 247-252.
5. Boudoiseau, G, Hugnet, C, Bras Gonçalves R, Vézilier F, Petit-Didier E, Papierok G, Lemesre JL 2009. Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs. *Vet Immunol Immunop.* 128, 71-78.
6. Brandão- Filho, SP, Campbell-Lundrum D, Brito MEF, 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, 488-494.
7. Brito, MEF., Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FGC 2001. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95, 203-206.
8. Brito, MEF, Silva CJ, Silva CM, Salazar PR, Coutinho JS, Reis LC, Pereira VRA, Brandão-filho SP, Medeiros ACR 2008. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. *Cad de Saúde Pública.* 24, 2445-2448.
9. Carvalho-Neta, A.V. Rocha RDR, Gontijo CMF, Reis AB, Martins-Filho OA 2006. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Arq Bras Med Vet zootec,* 58, 480-488.

10. Chiari, CA, Mayrink W, Magalhães PA 1973. Pesquisa de anticorpos, por imunofluorescência, em soros de pacientes com Leishmaniose tegumentar americana apresentando lesões cutâneas recentes. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 15,304-309.
11. Gontijo, CMF, Da Silva ES, De Fuccio MB, De Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade JD, Brazil RP, Melo MN, 2002. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica*, 81,143-150.
12. Gontijo, B, Carvalho, MLR 2003. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 36, 71-80.
13. Kar, K 1995. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol*. 21, 123-152.
14. Liew, F, O'Donnell, CA 1993. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 32, 161-259.
15. Machado-Jr, J.C. Florão A, Mattana FVR, Rocha FH, Santos CAM, Weffort-Santos AM 2006. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. *Braz J Pharmacognosy*, 16, 645-655.
16. Martins- Filho, OA, Pereira MES,Carvalho JF, Cançado JR, Brener Z 1995. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in Human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2, 569-573.
17. Marzochi, MCA 1992. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *J Bras Med*. 63, 82-104.
18. Mayrink, W, Botelho ACC, Magalhães PA, Batista SM, Lima AO, Genaro O, Costa CA, Melo MN, Michalick MSM, Williams P, Dias M, Caiaffa WT, Nascimento E, Machado-Coelho GLL 2006. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop*. 39, 14-21.
19. Mendonça, SCF Souza WJS, Nunes MP, Marzochi MCA, Coutinho SG 1988. Indirect immunofluorescence test in new world leishmaniasis: serological and clinical relationship. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 83, 347-55.

20. Mosleh, IM, Saliba EK, Al-Khateeb MS, Bisharat Z, Oumeish QY, Bitar W 1995. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in Jordan using indirect antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Tropica* 59, 163-172.
21. Mukbel, R, Petersen CA, Jones DE 2006. Soluble factors from *Leishmania* major-specific CD4⁺T cells and B cells limit *L. amazonensis* amastigote survival within infected macrophages. *Microb Infect* 8, 2547-2555.
22. Nakage APM, Santana AE, Cápua MLB, Coelho PS 2005. Flow cytometry methodology and application in the veterinary hematology. *Ciênc Rural*, 35, 966-973.
23. Netto, EM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Costa JM, Cuba CC, Barreto AC, Badaró R, Johnson WD, Jones TC. 1990. Long-term follow-up of patients with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection and treated with Glucantime. *Trans R Trop Med Hyg* 84, 367-70.
24. O'Neil CE, Labrada M, Saravia NG 1993. *Leishmania (Viannia) panamensis* – specific IgE and IgA antibodies relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 49, 181-188.
25. Pirmez, C, Trajano VS, Paes-oliveira Neto M, Da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, Degrove W, Fernandes O 1999. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 37, 1819-1823.
26. Pissinati, JF, Gomes IT, Peruhype-Magalhães V, Dietze R, Martins-Filho OA, Lemos EM 2008. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis, *J Immunol Methods.* 336, 193-202.
27. Reis, LC Brito ME, Almeida EL, Félix SM, Medeiros AC, Silva CJ, Pereira VR 2008. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 41, 439-443.
28. Rocha, RDR, Gontijo CMF, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Corrêa-Oliveira A, Marques MJ, Genaro O, Mayrink W, Martins-Filho AO 2002. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa de leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 35, 551-562.

29. Rocha, RDR, Gontijo CMF, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Corrêa-Oliveira A, Ferrari TC, Marques MJ, Mayrink W, Martins-Filho 2006. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. Trop Med and Intl Health 11, 156-166.
30. Romero, GAS, Orge MGO, Guerra MVF, Paes MG, Macêdo VO, Carvalho EM 2005. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. Acta Tropica. 93, 49-56.
31. Sampaio RNR, Gonçalves Mde C, Leite VA, França BV, Santos G, Carvalho Mdo S, Tauil PL 2009. Study on the transmission of American cutaneous leishmaniasis in the Federal District. Rev Soc Bras Med Trop 42, 686-690.
32. Santiago, MA, Ribeiro FC, Mouta-Confort E, Nascimento LD, Schubach Ade O, Madeira Mde F, Bertho AL. 2008. Differentiation between canine cutaneous and visceral leishmaniasis by the detection of immunoglobulin G specific for *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens using flow cytometry. Vet Parasitol 154, 341-346.
33. Schubach A, Marzochi MCA, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araújo ML, Oliveira ALC, Pacheco RS, Momen H, Conceição-Silva F, Coutinho SG, Marzochi KBF 1998. Cutaneous scars in american tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure.. Am J Trop Med Hyg 58, 824-827.
34. Souza WJS, Coutinho SG, Marzochi MCA, Toledo LM, Gottlieb MV 1982. Utilização da reação de imunofluorescência indireta no acompanhamento da terapêutica da Leishmaniose Tegumentar Americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 77, 247-253.
35. Szargiki R, Castro EA, Luz E, Kowalthuk W, Machado AM, Thomaz-Soccol V 2009. Comparison of Serological and Parasitological Methods for Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis in the State of Paraná, Brazil. Braz J Infect Dis 13, 47-52.
36. Tavares CA, Fernandes AP, Melo MN 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis. Exp Rev Mol Diagn 3, 657-667.

37. Thomas BN, Buxbaum LU 2008. Fc_{RIII} Mediates Immunoglobulin G-Induced Interleukin-10 and Is Required for Chronic *Leishmania mexicana* Lesions. *Infect Immun* 76, 623-631.
38. Trujillo, C, Ramírez R, Vélez ID, Berberich C. 1999. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett* 70, 203-209.
39. Vexenat, AC, Santana JM, Teixeira AR 1996. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop*. 38, 177-185.
40. Vieira, LM Dussé LMSA, Martins-Filho OA, Carvalho MG 2003. Flow cytometric assay optimization for peripheral blood monocyte tissue factor analysis. *Rev Bras Hematol Hemoter* 25, 141-147.

FIGURES

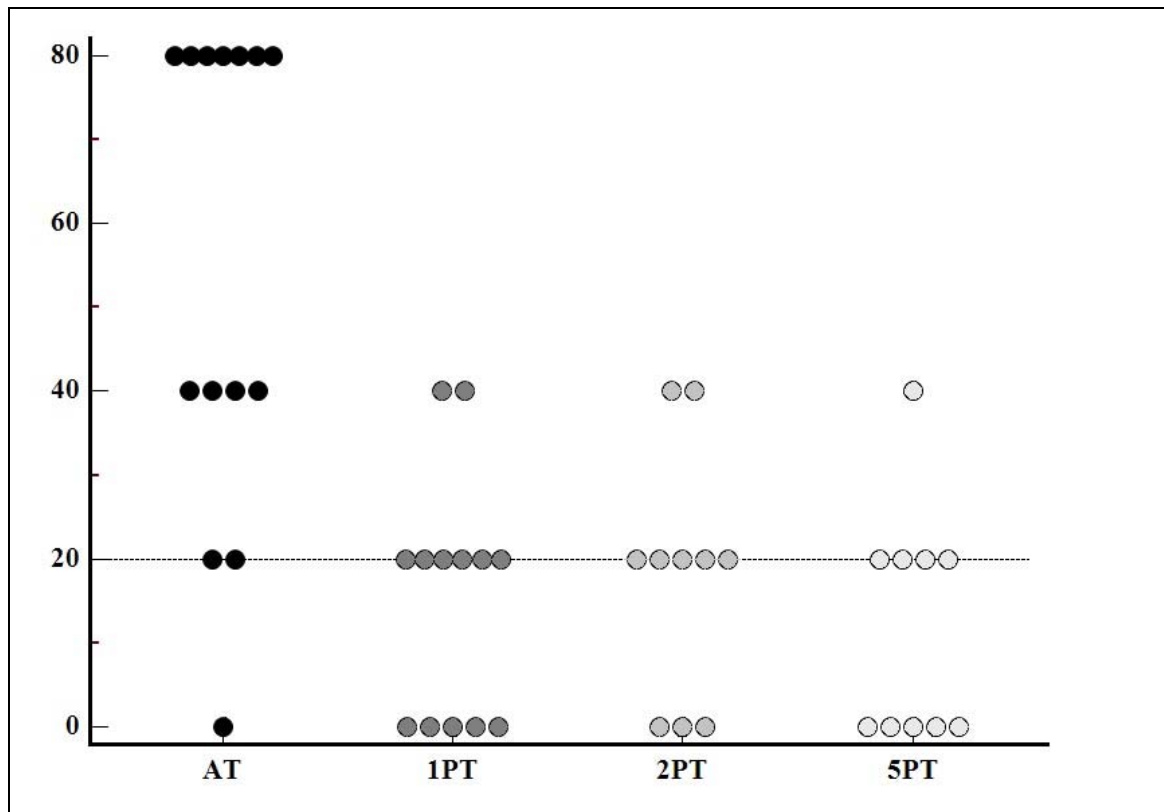


Figura 1: IgG reactivity in sera of patients before and 1, 2 and 5 years after treatment, subjected to indirect immunofluorescence method. The dotted line corresponds to the cutoff of 1:20.

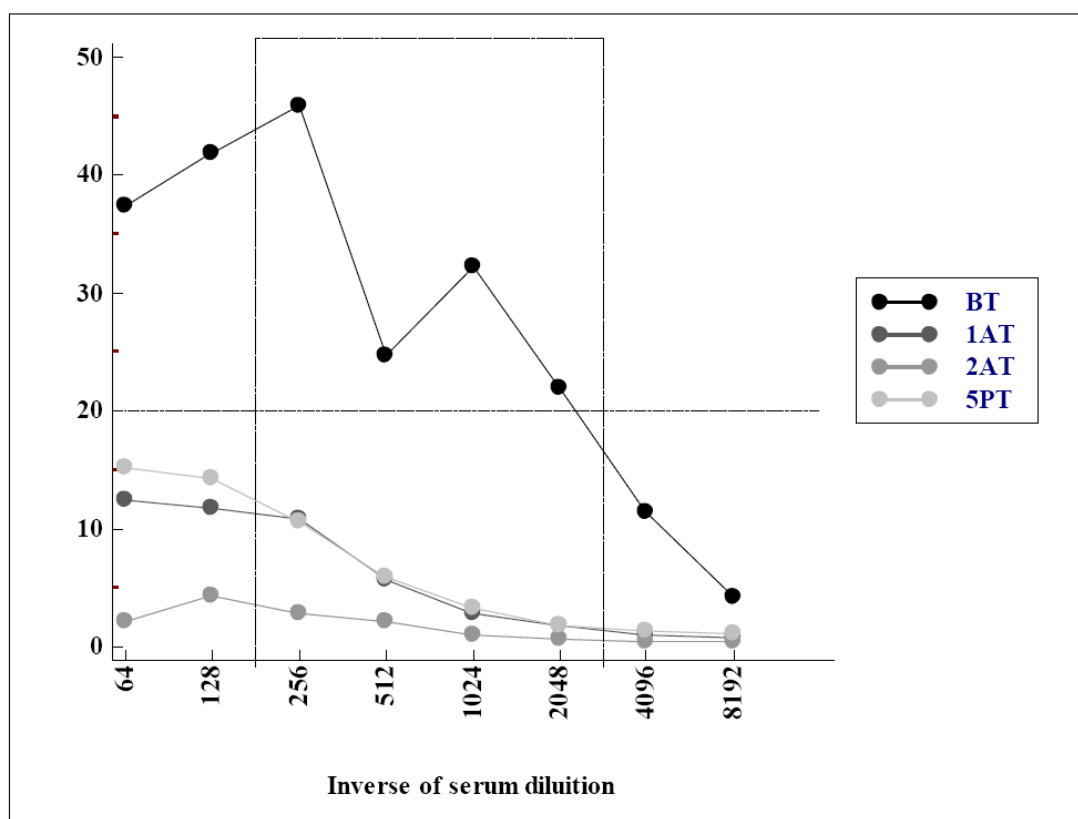
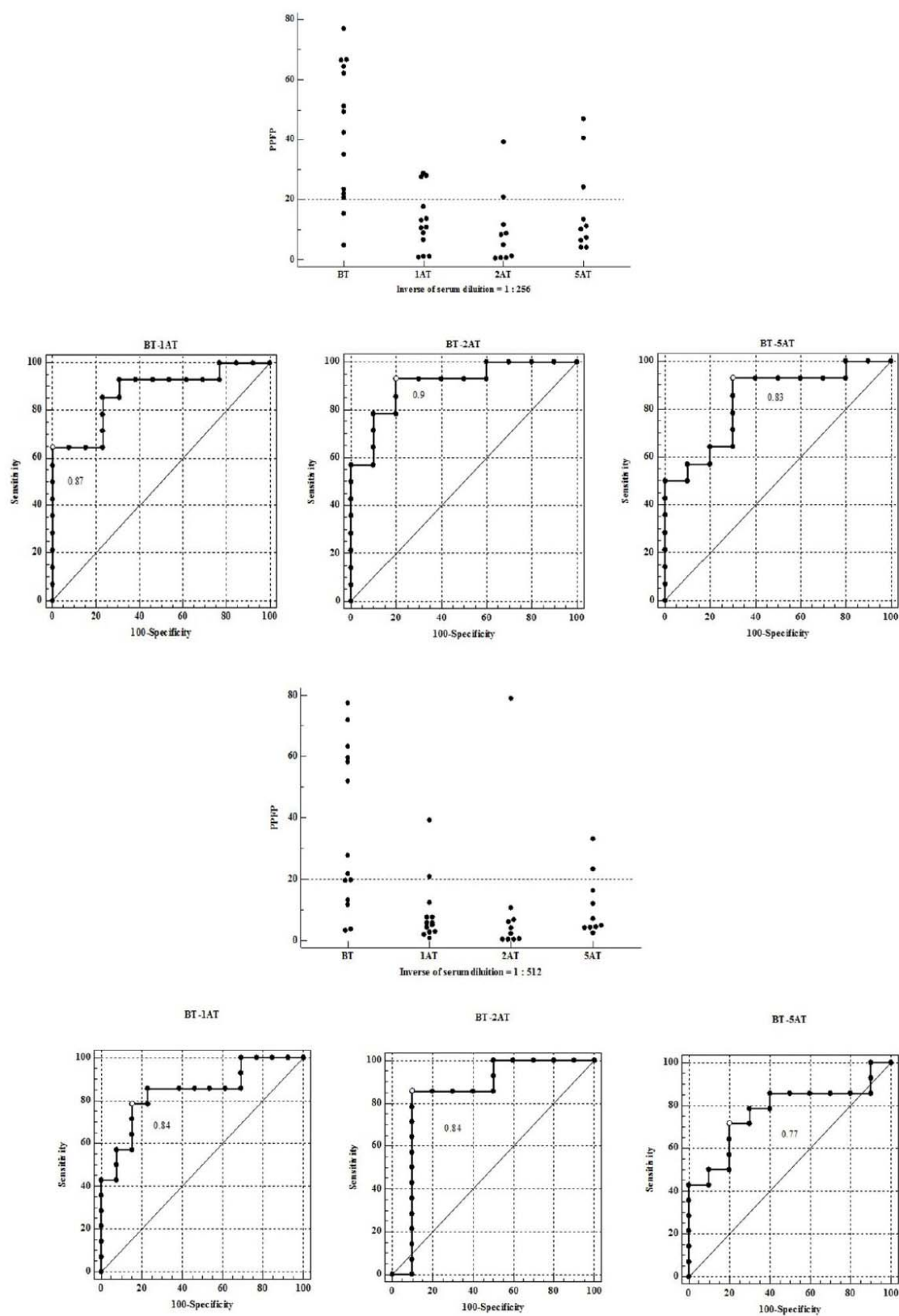


Figura 2: Titration curves of antibodies IgG anti-living promastigotes of *L. (V.) braziliensis* present in sera of patients classified as the presence of injury (AT) and the absence of injury (1, 2 and 5 years PT). The dotted line corresponds to a cutoff of 20% PPFP.



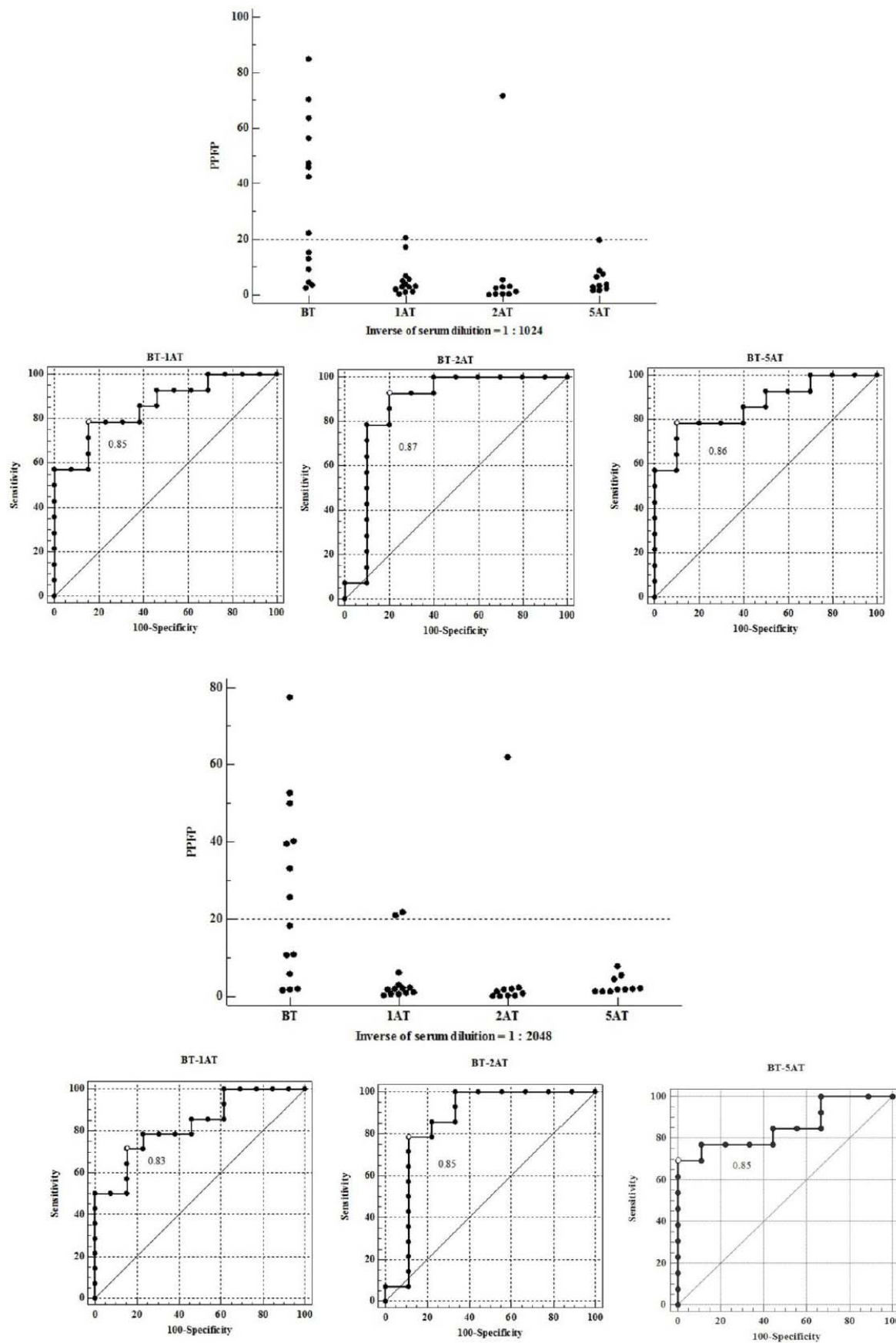


Figure 3: Evaluation of the flow cytometry assay applicability on identifying patients with active ATL from the sera of patients from the region title with 256, 512, 1024 and 2048 reactivity between BT and 1, 2 and 5 years AT. ROC curve with AUC in different times. The dotted line corresponds to a cutoff of 20% PPFP.

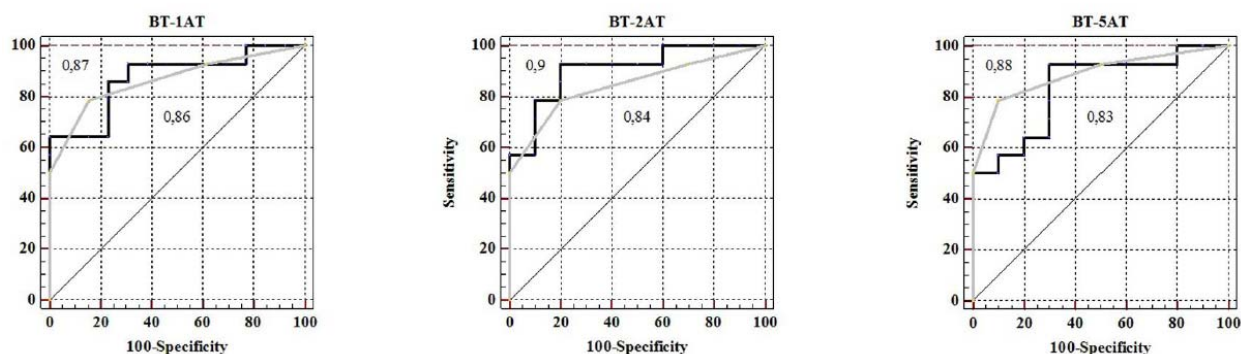


Figure 4: Comparison between ROC curves of IFA (--) and flow cytometry (--), BT with 1, 2 and 5 years AT, built from the performance, sensitivity and 100 - specificity of the evaluated tests. AUC = area under the curve of flow cytometry and IFA.

TABLE

Tabela1: Characterization of study population on the laboratory diagnosis

Exams	Laboratory diagnosis				Total patients evaluated
	Nº (+)	%	Nº(-)	%	
IDRM	12	85,71	2	14,29	14 - 100%
PCR	12	92,31	1	7,69	13 - 100%
Direct search	6	42,86	8	57,14	14 - 100 %
Isolation in culture	6	42,86	8	57,14	14 - 100%
IFA	13	92,86	1	7,14	14 - 100%

IDRM= Montenegro's intradermal reaction; PCR= Polymerase chain reaction; IFA= Indirect Immunofluorescence Assay