



**UFG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL  
E SAÚDE PÚBLICA**

**NATALLIA MOREIRA LOPES LEÃO**

---

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA E (IgE)  
ANTI - LEISHMANIA COMO MARCADOR DE PROGNÓSTICO  
NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.**

---

**Goiânia  
2015**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinalada abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

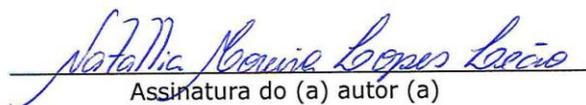
Nome completo do autor: Natallia Moreira Lopes Leão

Título do trabalho: Avaliação da imunoglobulina E (IgE) anti - leishmania como marcador d prognóstico na Leishmaniose Tegumentar Americana.

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 29 / 08 / 2016

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**NATALLIA MOREIRA LOPES LEÃO**

---

---

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA E (IgE)  
ANTI - LEISHMANIA COMO MARCADOR DE PROGNÓSTICO  
NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.**

---

---

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Tropical e  
Saúde Pública da Universidade  
Federal de Goiás para obtenção do  
Título de Mestre em Medicina  
Tropical e Saúde Pública.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Miriam Leandro  
Dorta

**Goiânia  
2015**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Leão, Natália Moreira Lopes

Avaliação da utilização da imunoglobulina E (IgE) anti - Leishmania como marcador de prognóstico na Leishmaniose Tegumentar Americana [manuscrito] / Natália Moreira Lopes Leão. - 2015. xv, 47 f.: il.

Orientador: Profa. Dr<sup>a</sup>. Miriam Leandro Dorta.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2015.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. ELISA. 2. IgE. 3. L. (V.) braziliensis. 4. LTA. 5. Tratamento. I. Dorta, Dr<sup>a</sup>. Miriam Leandro, orient. II. Título.

CDU 576.8



**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE NATALLIA MOREIRA LOPES LEÃO** - Aos dois dias do mês de julho do ano de 2015 (02/07/2015), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. MIRIAM LEANDRO DORTA, ROQUELINE A. G. M. F. AVERSI FERREIRA e FÁTIMA RIBEIRO DIAS, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no Centro Universitário Unirg, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: “Avaliação da utilização da imunoglobulina E (IgE) anti-Leishmania como marcador de prognóstico na leishmaniose tegumentar americana”, em nível de **MESTRADO**, área de concentração em **PARASITOLOGIA**, de autoria de **NATALLIA MOREIRA LOPES LEÃO**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. Miriam Leandro Dorta, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1304/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Miriam Leandro Dorta  
Profa. Dra. Roqueline A. G. M. F. Aversi Ferreira  
Prof. Dra. Fátima Ribeiro Dias

**Aprovado / Reprovado**

Aprovado  
Aprovado  
Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata HABILITADA, (**Habilitado ou não Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **PARASITOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 35 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Miriam Leandro Dorta (IPTSP/UFG)  
Profa. Dra. Roqueline A. G. M. F. Aversi Ferreira (ITAPAC/TO)  
Prof. Dra. Fátima Ribeiro Dias (IPTSP/UFG)  
Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura  
M. Dorta  
Roqueline A. G. M. F. Aversi Ferreira  
Fátima Ribeiro Dias  
Kariny V. Soares e Silva

I  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública  
da Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluno (a): Natallia Moreira Lopes Leão**

---

**Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Miriam Leandro Dorta**

---

---

**Membros:**

**1. Dr<sup>ª</sup>. Miriam Leandro Dorta**

**2. Dr<sup>ª</sup>. Roqueline Ametila e Glória Martins de Freitas Aversi Ferreira**

**3. Dr<sup>ª</sup>. Fátima Ribeiro Dias**

**Data:02/07/2015**

**Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial na minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, ao meu papai Diomar Lopes, minha mamãe Socorro Moreira e ao meu esposo Mardei Leão que sempre foram meus incentivadores.**

## AGRADECIMENTOS

---

Aos meus pais, Diomar Lopes e Socorro Moreira, por sempre me conduzirem no caminho dos estudos e por todos os ensinamentos de vida. Obrigada por todos os sacrifícios e privações que passaram e passam para que eu alcance os meus objetivos. Eu dedico a vocês o meu título. Amo vocês!

Ao meu esposo Mardei Leão, companheiro fiel, pelo seu exemplo de dedicação em tudo que faz e por tudo que ainda temos por viver.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miriam Leandro Dorta, pelo voto de confiança quando abriu as portas não só do laboratório, mas também de sua casa para mim. Pela amizade, carinho e paciência em me orientar nesse trabalho de tão grande importância para minha carreira científica.

À professora Dr<sup>a</sup>. Fátima Ribeiro Dias e ao professor Dr<sup>o</sup>. Milton Oliveira, por saberem me ouvir e me auxiliar quando possível.

À Aldenira, por toda dedicação que teve para me ajudar nessa pesquisa. Por não ter me deixado sozinha nessa jornada. Minha linda continue sempre assim você vai longe. Sem sua ajuda tudo se tornaria mais difícil.

À Natalia, nossa técnica mais organizada. Obrigada pela paciência e carinho, sempre!

Ao José Vitor que não mediu esforços para me ensinar todo seu conhecimento já adquirido no Laboratório. Será inesquecível!

A todos os colegas do laboratório em geral, pela colaboração prestada em diversos momentos.

Aos meus colegas do Minter UnirG/UFG, pelo apoio nos momentos mais difíceis dessa trajetória rumo ao mestrado. Em especial as minhas amigas Poliana Veras, Aline Matos e Joana Estela. Muitos obstáculos foram impostos para mim durante esses últimos anos, mas graças a vocês eu não fraquejei.

À toda equipe do Minter IPTSP/UFG, a equipe da Propesc de Gurupi/TO e a Dr<sup>a</sup>. Karin Collier, por todo carinho e auxílio prestado.

Aos meus amigos e irmãos de coração Ricardo Rodrigues e Yara Silveira e aos meus familiares, em especial meus primos Rômulo e Ana Paula (afilhada) que me acolheram em sua casa, sem medir esforços para me suportar o tempo necessário. Meu eterno carinho!

**Muito Obrigada!**

## SUMÁRIO

---

1	INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1	Epidemiologia, Transmissão e Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	1
1.2	Diagnóstico e Tratamento da LTA .....	4
1.3	Resposta Imune da LTA.....	6
1.4	IgE na LTA .....	10
2	JUSTIFICATIVA .....	13
3	OBJETIVOS.....	14
4	MÉTODOS .....	15
4.1	Local do estudo e aspectos éticos .....	15
4.2	Amostragem.....	15
4.3	Preparação do extrato antigênico de <i>L. (V.) braziliensis</i> para execução dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA).....	16
4.4	Avaliação do reconhecimento do extrato antigênico de <i>L. (V.) braziliensis</i> por anticorpos de pacientes com LTA: Pesquisa de IgE e IgG por ELISA.....	16
4.5	Análise estatística .....	18
5	RESULTADOS.....	19
5.1	Padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando extrato antigênico de <i>L. (V.) braziliensis</i> para detecção de IgE específica nos plasmas de pacientes com LTA .....	19
5.2	Características dos pacientes com LTA atendidos no ambulatório de endemias do hospital Anuar Auad do estado do Goiás .....	20
5.3	Avaliação do reconhecimento de extrato antigênico de <i>L. (V.) braziliensis</i> por anticorpos IgE de pacientes com LTA .....	22
5.4	Avaliação da especificidade do ELISA utilizando amostras de pacientes sadios e de pacientes com outras doenças .....	23
5.5	Avaliação da detecção de IgE de acordo com a manifestação clínica de pacientes com LTA .....	24

5.6 Associação da associação entre os níveis de IgE e a intradermorreação de Montenegro .....	25
5.7 Avaliação da associação entre aspectos clínicos e níveis de IgE nos pacientes com LTA .....	27
5.8 Avaliação da associação entre os níveis de IgE e a cura clínica em pacientes com LTA .....	28
6 DISCUSSÃO .....	29
7 CONCLUSÕES .....	34
8 REFERÊNCIAS .....	35
ANEXO 1 .....	43
ANEXO 2 .....	47

## TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

---

---

<b>Tabela</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Tabela 1	Características dos pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada e Leishmaniose Mucosa.	21
Tabela 2	Avaliação do desfecho clínico após tratamento em pacientes com LTA IgE reagentes e IgE não reagentes.	28

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura 1	Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento de parasitos do gênero <i>Leishmania sp.</i>	2
Figura 2	Fluxograma: Diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.	4
Figura 3	Ensaio imunoenzimático para detecção de IgE específica para <i>L.(V.) braziliensis</i> (conjugado utilizado na diluição de 1/250).	19
Figura 4	Ensaio imunoenzimático para detecção de IgE específica para <i>L.(V.) braziliensis</i> (conjugado utilizado na diluição de 1/100).	20
Figura 5	Detecção de anticorpos IgE específicos para antígenos de <i>L. (V.) braziliensis</i> no plasma de pacientes com LTA.	22
Figura 6	Detecção de anticorpos IgE para antígenos de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> em amostras séricas de pacientes sadios e pacientes com outras doenças.	23
Figura 7	Níveis de anticorpos IgE específicos para antígenos de <i>L. (V.) braziliensis</i> no plasma de pacientes com as formas clínicas LCL e LM de LTA.	24

Figura 8	Associação entre os níveis de IgE e a intradermorreação de Montenegro.	26
Figura 9	Distribuição do número de lesões de pacientes com a forma clínica LCL nos pacientes não reagentes para IgE e nos pacientes reagentes para IgE.	27

<b>Anexo</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Anexo 1	Parecer do Comitê de Ética	43
Anexo 2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	47

## **SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS**

---

<b>AH</b>	Análise Histopatológica
<b>ELISA</b>	Ensaio Imuno Enzimático
<b>FcεRI</b>	Receptor de Alta Afinidade para IgE
<b>HDT (HAA)</b>	Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>IDRM</b>	Intradermorreação de Montenegro
<b>IFI</b>	Imunofluorescência Indireta
<b>IFN-γ</b>	Interferon gama
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgG1</b>	Imunoglobulina G1
<b>IgG2</b>	Imunoglobulina G2
<b>IgG3</b>	Imunoglobulina G3
<b>IgG4</b>	Imunoglobulina G4
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-13</b>	Interleucina 13
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>INGOH</b>	Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia

**IPTSP** Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás

**IR** Índice de Reatividade

**LCD** Leishmaniose Cutânea Disseminada

**LCL** Leishmaniose Cutânea Localizada

**LD** Leishmaniose Cutânea Difusa

**Leishbank** Banco Imunológico de Leishmaniose da Região Centro - Oeste

**LM** Leishmaniose Mucosa

**LMC** Leishmaniose Mucocutânea

**LTA** Leishmaniose Tegumentar Americana

**LV** Leishmaniose Visceral

**NO** Óxido Nítrico

**OMS** Organização Mundial de Saúde

**PBS** Solução Salina Tamponada com Fosfato

**PCR** Reação em Cadeia da Polimerase

**RNA** Ácido Ribonucleico

**SFB** Soro Fetal Bovino

**SFM** Sistema Fagocitário Mononuclear

**Th1** Linfócito T auxiliar 1

**Th2** Linfócito T auxiliar 2

**TNF** Fator de Necrose Tumoral

**UFG** Universidade Federal de Goiás

## RESUMO

---

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças, com grande diversidade epidemiológica e clínica. A detecção de IgE pode constituir uma ferramenta valiosa para o prognóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). O objetivo do presente trabalho foi avaliar se Imunoglobulina E (IgE) anti - *Leishmania* podem ser utilizados como biomarcadores de prognóstico na LTA. Foi realizada a padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando extrato antigênico de *L. (V.) braziliensis* para detecção de IgE específica para leishmânia, nos plasmas de pacientes com LTA. Foi determinado que a diluição que discriminava amostras positivas de negativas era de 1/20 para o plasma e 1/100 para o anticorpo anti-IgE marcado com peroxidase. Dos 40 pacientes com LTA atendidos no ambulatório de endemias do Hospital Anuar Auad (HDT/GO), Goiânia-GO, entre 2009 e 2012, 27 apresentavam leishmaniose cutânea localizada (LCL) e 1 leishmaniose mucosa (LM). Destes pacientes, 27 eram do sexo masculino e 13, feminino. A idade dos pacientes com LCL variou entre 18 a 65 anos e com LM, de 25 a 61 anos. Os pacientes com LCL apresentavam de uma a 20 lesões, os tamanhos das lesões variaram entre 0,2 a 7 cm e o tempo das lesões ao diagnóstico variou de 0,5 a 4 meses e com LM de 0,5 a 120 meses. A positividade dos testes laboratoriais AH, IDRM, IF e Elisa para IgG foi de 80%, 67,5%, 42,5% e 87,5% respectivamente. Foi realizada análise de reatividade cruzada com amostras de pacientes com blastomicose, malária, leishmaniose visceral (LV), doença de chagas e toxoplasmose e apenas uma amostra de paciente com LV (10%) foi reagente, a especificidade do teste foi de 98,3%. A detecção de IgE específica ocorreu em 40% dos pacientes com LTA. Não houve correlação entre as quantidades de IgE e os resultados da IDRM. Não foi observada correlação entre os índices de IgE e o número de lesões em pacientes com LCL. Não foi detectada uma associação entre cura ou não cura clínica e os índices de reatividade de IgE. Um aumento do número de amostras de pacientes é necessário para melhorar a acurácia dos resultados.

**Palavras Chaves:** ELISA, IgE, *L. (V.) braziliensis*, LTA, tratamento

## ABSTRACT

---

Leishmaniasis comprises a disease group with a great epidemiological and clinical diversity. The detection of IgE can be an important tool for prognosis of American Tegumentary Leishmaniasis (LTA). The objective of this present work was to assess if the immunoglobulin E (IgE), anti - *Leishmania* can be used as biomarkers for prognosis in LTA. The standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out applying antigenic extract of *L. (V.) braziliensis* to detect IgE specific for leishmania in LTA patients' plasmas. It was determined that the dilution which differed positive from negative samples was 1/20 for plasma and 1/100 for peroxidase labeled anti-IgE antibody. Forty LTA patients were assisted in the laboratory of endemic diseases at AnuarAued Hospital (HDT/GO), Goiânia - GO, between 2009 and 2012. Twenty-seven of those patients showed localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and 1 showed mucosal leishmaniasis (LM). Twenty-seven of those patients were male and thirteen were female. The LCL patients' ages varied between 18 to 65 years and LM patients' ages varied from 25 to 61 years. The LCL patients showed 1 to 20 lesions whose sizes varied from 0,2 to 7 cm and the duration of the lesion diagnostic varied from 0,5 to 4 months, and in LM patients it varied from 0,5 to 120 months. The positive result of the AH, IDRM, IF and Elisa lab tests for IgG was 80%, 67,5%, 42,5% and 87,5% respectively. A cross - reactivity analysis was performed using samples of patients with blastomycosis, malaria, visceral leishmaniasis (LV), Chagas disease and toxoplasmosis and only one sample from an LV patient (10%) was positive, the test was 98,3% precise. The specific IgE detection occurred in 40% of the LTA patients. No correlation between the quantity of IgE and IDRM results was found. No correlation between the index of IgE and the number of lesions in LCL patients was observed. No association between clinical cure or no cure and the index of IgE reactivity was detected. A higher number of patients' samples are necessary to obtain more accurate results.

**Key words:** ELISA, IgE, *L. (V.) braziliensis*, LTA, treatment.

# **1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA**

---

## **1.1 Epidemiologia, Transmissão e Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)**

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças, com grande diversidade epidemiológica e diferentes manifestações clínicas (Brasil, 2010; Singh et al., 2012). São causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae*, e ordem *Kinetoplastida*, que apresenta um flagelo e dois genomas: DNA nuclear e kDNA. Os insetos vetores de transmissão dos protozoários aos hospedeiros mamíferos são do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Ross, 1903; Ashford, 2000).

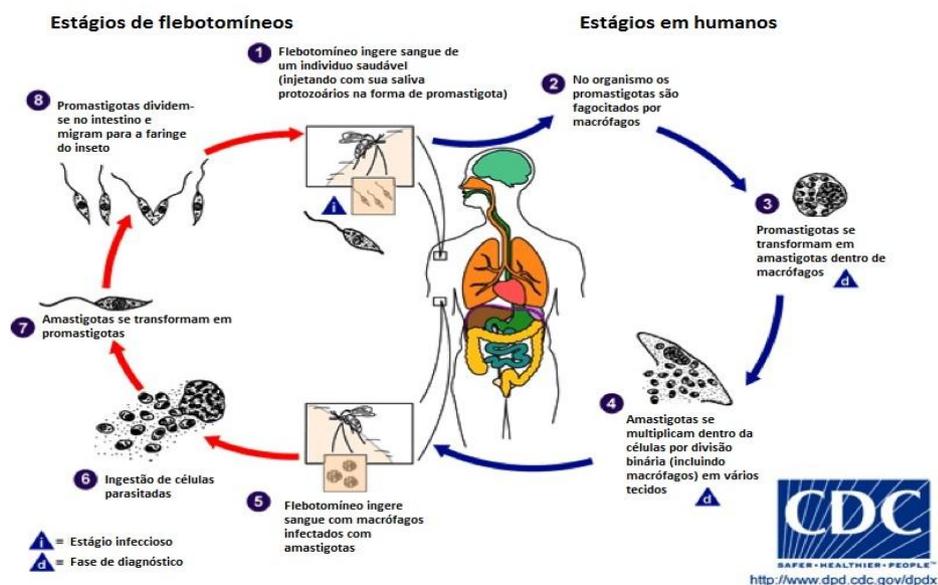
As leishmanioses constituem um dos principais problemas de Saúde Pública no mundo e um grande risco para pessoas que vivem ou viajam para áreas endêmicas (Soong et al., 2012). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a prevalência mundial da doença seja de 12 milhões de casos, com uma mortalidade anual de 60.000 casos (WHO, 2015).

A LTA é uma doença amplamente distribuída em todo o território brasileiro. No ano de 2003, foi confirmada sua autoctonia em todas as unidades federadas do país (Brasil, 2012). Para Shaw (2007) o grande aumento dos números de casos de leishmaniose está relacionado com as mudanças ambientais, migrações descontroladas, trabalhos em áreas de risco, turismo ecológico, dificuldades de tratamento e, ainda, hospedeiros imunocomprometidos.

No Brasil, os maiores percentuais de casos de LTA ocorrem nas regiões Norte e Nordeste, seguidos das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (Brasil, 2010). Em 2013, foram notificados 18.675 mil casos de LTA no país, sendo, destes, 374 casos no estado de Goiás e 494 casos no estado do Tocantins (Brasil, 2015).

No Brasil, são reconhecidas seis espécies de leishmanias que causam a LTA no homem, principalmente *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* e, mais raramente, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* (Grimaldi e Tesh, 1993; Passos et al., 1999). Cerca de 90% dos casos de LTA são causados por *L. (V.) braziliensis*; esta é a espécie que desenvolve as lesões mais graves e que está frequentemente associada à invasão de mucosas (Silveira et al., 2009).

O ciclo biológico das leishmanias é do tipo heteroxênico. Os parasitos apresentam dois estágios morfologicamente e bioquimicamente distintos, a forma amastigota e a promastigota, conforme demonstrado na (Fig. 1). A forma amastigota (esférica e sem flagelo visível) multiplica-se dentro das células do sistema fagocitário mononuclear (SFM). Esta forma é liberada das células ingeridas pelo inseto vetor (flebotomíneo), durante o repasto sanguíneo em hospedeiros mamíferos infectados, e se diferencia na forma promastigota (longa e flagelada) no intestino do inseto (Ashford, 2000; Gontijo e Carvalho, 2003). De acordo com Rey (2011), ainda no intestino do inseto, a forma promastigota passa por um processo denominado metaciclogênese, durante o qual as formas promastigotas procíclicas param de se dividir e tornam-se infectantes (promastigotas metacíclicas). Durante o próximo repasto sanguíneo do inseto vetor, as formas promastigotas metacíclicas são transmitidas ao hospedeiro, que pode ser o homem.



**Figura 1.** Desenho esquemático do ciclo biológico dos parasitos do gênero *Leishmania* sp. Fonte: [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)

Após a inoculação de *Leishmania sp* em seres humanos, dependendo das características dos parasitos e da resposta imune, no local da picada do inseto, ocorre o desenvolvimento de uma lesão cutânea, que muitas vezes desaparece, espontaneamente, ou pode progredir. A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais comum, apresentando de uma a dez lesões ulceradas ou úlcero - crostosas, que apresenta cura clínica espontânea ou após tratamento, ou pode evoluir para outras formas clínicas da LTA (Silveira et al., 2009; Goto e Lindoso, 2010). Grande parte dos pacientes apresenta uma boa resposta imune celular, que pode ser avaliada por meio da Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e que contribui para a cura clínica da doença (Convit et al., 1993).

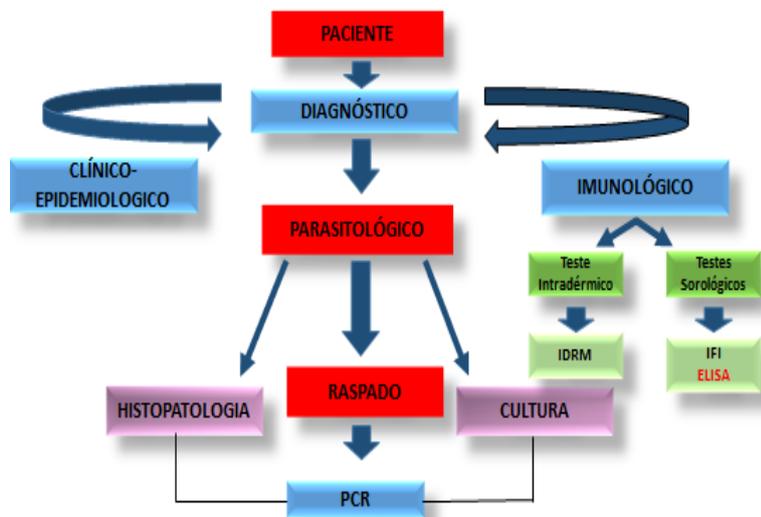
A leishmaniose cutânea disseminada (LCD) é caracterizada por inúmeras lesões, em variadas partes do corpo, com aparência acneiforme e, posteriormente, podem ulcerar. É associada às espécies *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis* no Brasil, mas pode ser causada por outras espécies em outros países, como na Guiana Francesa, onde a espécie causadora é *L. (V.) guyanensis* (Silveira et al., 2009; Goto e Lindoso, 2010). Os pacientes apresentam lesões com poucos parasitos e uma resposta imune celular, que associada ao tratamento, leva à cura clínica (Machado et al., 2011).

Outra forma clínica da LTA com múltiplas lesões é a leishmaniose cutânea difusa (LD), causada pela espécie *L. (L.) amazonensis*. É uma forma clínica rara, porém grave, que apresenta múltiplas lesões e é difusa por toda a pele em forma de nódulos, caracterizada pela elevada carga parasitária. Esta doença é considerada grave, pois o paciente não apresenta resposta imune celular contra os parasitos, o que é necessário para a cura (Silveira et al., 2009; Goto e Lindoso, 2010).

A leishmaniose mucocutânea (LMC), também conhecida como leishmaniose mucosa (LM), na maioria das vezes é secundária às lesões cutâneas, porém alguns pacientes apresentam lesões mucosas sem evidências de LCL anteriormente. Na LM existe predomínio de lesões na mucosa nasal, podendo ocorrer ulceração e perfuração do septo nasal (Diniz et al., 2011). A LM é associada, principalmente, à espécie *L.(V.) braziliensis*, mas na região Norte do Brasil, *L.(V.) guyanensis* também vem sendo detectada em pacientes com LM, embora sejam raros os casos relatados (Guerra et al., 2011) .

## 1.2 Diagnóstico e Tratamento da LTA

Para fazer o diagnóstico da LTA diversos aspectos devem ser levados em consideração, tais como os aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (Fig.2) (Basano, 2004; Gontijo e Carvalho, 2003).



**Figura 2.** Fluxograma: Diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. IDRM: Intradermorreação de Montenegro; IFI: Imunofluorescência Indireta; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase. Fonte: Adaptação de Gontijo e Carvalho, 2003.

De acordo com Brasil (2010), o diagnóstico epidemiológico da LTA, baseia-se na procedência de áreas endêmicas, atividade ocupacional e lazer em áreas de vegetação primária, margens de rios ou desmatamento e a ocupação de áreas de matas secundárias. A realização do diagnóstico clínico da LTA nem sempre é simples e imediato, devido ao amplo espectro de lesões, visto que ele é realizado com base nas características da lesão e na anamnese do paciente (Saraiva, 1998; Gontijo e Carvalho, 2003).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por meio de métodos parasitológicos e imunológicos. O exame direto é o método de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução. A pesquisa da forma amastigota é feita em material da borda da lesão, obtido por escarificação, aspiração ou biópsia, para visualização microscópica. Nas infecções por *L. (V.) braziliensis* a probabilidade de encontro do parasito está em torno de 100% nos

dois primeiros meses de evolução da lesão cutânea, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses (Gontijo e Carvalho, 2003). O exame indireto consiste no isolamento do parasito por meio do cultivo *in vitro* entre 24°C e 26°C ou por inoculação do material coletado da lesão em animais de experimentação (Walton et al., 1977; Shaw e Lainson, 1981; Oliveira et al., 2010). Esse método pode apresentar algumas limitações, como a dificuldade de manter o parasito *in vitro* e também o tempo necessário para o seu crescimento (três a dez dias) (Gontijo e Carvalho, 2003; Oliveira et al., 2010).

A análise histopatológica (AH) permite um diagnóstico confirmatório para a LTA, ele possui uma sensibilidade de cerca de 70%. É realizado, mediante biópsia das lesões e preparo de cortes histológicos para coloração com hematoxina e eosina e para imuno-histoquímica para identificar as amastigotas (Andrade-Narvaez et al., 2005; Duarte e Rochael, 2006; Oliveira et al., 2010).

Também têm sido usados no diagnóstico de leishmaniose, os métodos moleculares, que empregam a reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*), que apresentam elevada sensibilidade 98% e especificidade 100%. Eles permitem a identificação da espécie dos parasitos, o que é relevante do ponto de vista epidemiológico e terapêutico. A principal desvantagem das técnicas moleculares é a necessidade de equipamentos mais sofisticados e técnicos treinados (Foulet et al., 2007; Shahbazi et al., 2008; Hajjarian et al., 2011).

Dentre os métodos imunológicos, a IDRM e os testes sorológicos, Imunofluorescência Indireta (IFI) são os mais utilizados (Vidigal et al., 2008). A IDRM é baseada na mensuração da resposta de hipersensibilidade tardia após injeção de antígenos de *Leishmania* na pele. É segura e especialmente valiosa nas áreas de prevalência de *L. (V.) braziliensis*. Esse teste pode ser negativo nos primeiros meses após o surgimento da lesão cutânea, em geral, é mais exacerbada na LM. É de fácil execução, porém nem sempre o paciente retorna ao serviço de saúde em 48 ou 72 horas para a leitura do resultado (Gontijo e De Carvalho, 2003; Vidigal et al., 2008).

O diagnóstico sorológico específico é baseado na presença de uma resposta imune humoral específica (Elmahallawy, et al., 2014). Testes sorológicos têm sido empregados no diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos (Gutierrez et al., 1991). No diagnóstico da LTA, a IFI para

detectar anticorpos IgE anti - *Leishmania sp*, é o teste recomendado pelo Ministério da Saúde, desde que associado a IDRM e/ou testes parasitológicos, visto que ocorre reação cruzada com outras doenças como LV e Doença de Chagas. Sua sensibilidade é em torno de 50% a 70% (Mendonça et al., 1988; Brito et al., 2000). Na LTA, a IFI apresenta resultados variáveis, não havendo correlação entre os níveis de anticorpos circulantes e o estágio da doença (Reis et al., 2008). Possui desvantagens, tais como a dificuldade de realização em grande escala, dependência de profissionais treinados para sua realização, necessidade do uso de microscópio de fluorescência e não é automatizado (Tavares et al., 2003; Brasil, 2007).

O teste de ELISA para diagnóstico sorológico, pode ser automatizado e utilizado em grande escala, permite avaliar a resposta imune humoral e pode prever ausência ou eficácia de resposta à terapêutica (Gontijo e Carvalho, 2003; Veja - Lopes, 2003). Na pesquisa de Barroso - Freitas et al., (2009), o ELISA utilizando *L. (V.) braziliensis* como antígeno apresentou sensibilidade de 75,6% e especificidade de 100,0% em pacientes com LCL e LM.

O sucesso do tratamento das leishmanioses depende do nível de desenvolvimento da infecção, da suscetibilidade do hospedeiro, da virulência da espécie infectante e da precocidade do diagnóstico. Foi preconizado pela OMS o antimonial pentavalente como fármaco de primeira escolha, na dose entre 10 a 20 mg/ Sb<sup>+5</sup> Kg/dia por 20 a 30 dias. No Brasil, na rede pública, é distribuído gratuitamente pelo Ministério da Saúde o antimoniato Glucantime (N – metil - glucamina), este deve ser usado com cautela e com monitoramento, pois apresenta potencial de toxicidade cardíaca, pancreática, hepática e renal. Outros fármacos como estibugloconato de pentamidina e anfotericina B podem ser usadas em paciente gestantes, porém contraindicado em paciente cardiopata e nefropata (Brasil, 2010).

### **1.3 Resposta Imune da LTA**

Inicialmente, o estudo da resposta imune a *Leishmania* foi observado em modelo murino de infecção por *L. major*. Foi demonstrado que a infecção de camundongos da linhagem C57BL/6 causa lesão localizada que cura após

algumas semanas. Esta resolução da infecção é associada ao desenvolvimento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares do tipo 1 (Th1, *T helper*), produtoras de interferon gama (IFN $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), que são citocinas ativadoras de macrófagos. Em contraste, a suscetibilidade à infecção foi observada em camundongos da linhagem BALB/c, os quais desenvolvem lesões persistentes, progressivas e pode ocorrer a disseminação dos parasitos para os órgãos viscerais. A falta de controle da infecção é associada ao desenvolvimento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares do tipo 2 (Th2), produtores de Interleucina 4 e 13 (IL - 4, IL - 13), que inibem a ativação dos macrófagos pelo IFN $\gamma$  (Heinzel et al., 1989; Scott e Scharon, 1994; Scott, 1998; Bogda et al., 2000; Sacks e Noben - Trauth, 2002).

No homem, as características do parasito e da resposta imune do hospedeiro parecem definir o amplo espectro clínico da infecção causada por *Leishmania*, porém, independente de qual seja a espécie envolvida, a cura clínica é obtida após a indução de uma eficiente resposta imune celular. Geralmente os pacientes com LCL apresentam resposta imune celular contra *Leishmania*, avaliada por intradermoreação, bem como resposta imune humoral. Na fase ativa da LCL, há predominância de células T CD4<sup>+</sup> com produção tanto de citocinas do tipo Th1 quanto do tipo Th2 (IFN- $\gamma$  e IL-4) (Convit et al., 1993). Na LD há predomínio de uma resposta Th2 com elevados níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 e ausência de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e baixa produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF -  $\alpha$ ) (Silveira et al., 2009).

Convit et al., (1993) demonstraram que existe uma forte resposta imune celular na LM que pode contribuir para a cura clínica, mas também contribui para lesão tecidual, ocorrendo uma resposta na IDRMM mais forte do que a de pacientes com LCL e ocorrendo uma mistura de respostas de linfócitos Th1 e Th2, com elevados níveis de interleucina 2, 5 (IL-2, IL-5), IFN- $\gamma$  e TNF, acarretando a não resolução da doença. De acordo com Gaze et al., (2006), pacientes com LM apresentam níveis mais elevados de citocinas inflamatórias (TNF e IFN- $\gamma$ ) e níveis mais baixos de IL-10 quando comparados com pacientes com lesões cutâneas.

Os pacientes com LTA desenvolvem uma resposta imune humoral desde a fase inicial da enfermidade, que se mantém durante o curso da infecção

e diminui após a eliminação da maioria dos parasitos (Walton et al., 1972). Os títulos de anticorpos são mais elevados na LD, sendo seguidos em magnitude pelos dos pacientes com LM e com LCL, que apresentam cargas parasitárias mais baixas. Níveis elevados de anticorpos estão associados com respostas não protetoras e com a gravidade da doença (Bryceson, 1970; Coutinho et al., 1998).

Estudos mostram que nas formas clínicas LCL e LMC, a predominância de isotipos imunoglobulina G 1, 2 e 3 (IgG1, IgG2 e IgG3) têm sido associadas à resposta do tipo Th1; já o perfil Th2 tem sido relacionado com a LD, com presença de imunoglobulina G 4 (IgG4) (Rodriguez et al., 1996; Souza et al., 2005). Pacientes com um maior tempo de evolução da doença apresentam altos níveis de IgE e em pacientes com a forma LMC, os níveis de imunoglobulina A (IgA) se mostram aumentados (O'Neil et al., 1993).

Bird et al., (1984) mostram em seu estudo que polissacarídeos induzem respostas com imunoglobulina G2 (IgG2), enquanto antígenos proteicos induzem predominantemente imunoglobulina G1 (IgG1) e imunoglobulina G3 (IgG3) e não induzem IgG2. Sabe-se que a produção de imunoglobulina G4 (IgG4) ocorre em infecções de longa duração sob estímulo por antígenos proteicos. Em indivíduos sadios, as proporções dessas subclasses são relativamente constantes (IgG1 = 60 – 70%, IgG2 = 20 – 30%, IgG3 = 6 – 9% e IgG4 = 2 – 3%) (French e Harrison, 1984), porém as concentrações e a forma como essas subclasses são reguladas durante a leishmaniose não são bem conhecidas (Solano - Gallego et al., 2001).

No homem, um importante aspecto dos estudos sorológicos para o conhecimento da LTA se desenvolveu a partir da associação entre a presença de uma resposta Th1 e Th2 e as classes e subclasses predominantes de imunoglobulinas específicas para *Leishmania*, durante o curso da infecção (El Amin et al., 1986; Rodriguez et al., 1996; Anam et al., 1999; Da Matta et al., 2000). Citocinas produzidas por linfócitos Th2 induzem os linfócitos B a produzirem classes e subclasses de imunoglobulinas deficientes na ativação do sistema complemento e induzem a produção de imunoglobulina E (IgE), que se liga a mastócitos podendo levar à indução de hipersensibilidade do tipo imediata. A IL-4 induz mudança de classe de imunoglobulina M (IgM) para IgG4 e IgE, enquanto a IL-5, de IgM para imunoglobulina A (IgA), e a interleucina 10 (IL - 10), de IgM para IgG3 (Finkelman et al., 1988).

Anam et al., (1999), estudando pacientes com Leishmaniose Visceral (LV), observaram que pacientes refratários ao tratamento com antimonial pentavalente apresentavam níveis elevados de IgG específica para *Leishmania* (principalmente as subclasses IgG3 e IgG4) e de IgE específica, em relação aos indivíduos que obtiveram cura clínica. Os pacientes que obtiveram sucesso com o esquema terapêutico apresentavam diminuição das concentrações séricas de anticorpos, seguindo a ordem: IgE>IgG>IgM>IgA e quanto às subclasses de IgG observou-se diminuição: IgG4>IgG1>IgG3>IgG2. Este estudo relata uma significativa diminuição de IgG4 nos pacientes que apresentam cura clínica e sugere que a queda de IgG4 possa ser utilizada como um marcador de cura.

Estudos realizados por Da Matta et al., (2000) relatam que pacientes com LV refratários ao tratamento com antimonial e que foram submetidos ao tratamento com anfotericina B obtiveram cura clínica e apresentaram redução de anticorpos seguindo a ordem: IgE>IgM>IgG>IgA e IgG1>IgG4>IgG3>IgG2. Os pacientes não responsivos a nenhum destes esquemas terapêuticos, apresentaram níveis variados de IgG, IgA, IgG2 e IgG3 e respostas significativamente elevadas de IgG1, IgG4 e IgE. Sugeriu-se que a manutenção dos níveis elevados de IgG1 poderia ser um possível marcador de resistência ao tratamento nestes pacientes, conjuntamente com os níveis de IgE, IgM e IgG4 (Anam et al., 1999). Níveis elevados de subclasses de IgG específica, em pacientes com LV, têm sido reportados em pacientes na Somália, Sudão e na Venezuela, sendo que nos soros dos pacientes da Somália houve um predomínio de IgG1 na doença ativa (El Amin et al., 1986; Shiddo et al., 1996; Chatterjee et al., 1998; El Assad et al., 1994). Nos soros de pacientes Sudaneses observou - se uma concentração elevada de IgG3 e IgG4 na fase ativa e a cura clínica foi correlacionada com o decréscimo de IgG3. Essas discrepâncias de resultados dos diferentes trabalhos estão relacionadas provavelmente com as variações étnicas e com os diferentes genótipos dos parasitos (El Assad et al., 1994).

Existem poucos trabalhos em pacientes com LTA, associando as subclasses de imunoglobulinas séricas predominantes às formas clínicas da doença e a evolução clínica após o tratamento. Esses estudos indicam que os pacientes com LCL apresentam concentrações de IgG1, IgG2 e IgG3 superiores às concentrações de IgG4. Enquanto nas formas mais graves existe uma

elevação de IgG1 (LM) e de IgG4 (LD) (Labrada et al., 1989; Ulrich et al., 1995; Rodriguez et al., 1996; Pedras et al., 2001).

Os mecanismos imunológicos que modulam a produção das classes e subclasses de imunoglobulinas durante a leishmaniose não são bem conhecidos, mas é sabido que as citocinas presentes no microambiente são fundamentais neste processo. De forma geral, as respostas Th2, IL - 4 e IgG4 têm sido associadas com a suscetibilidade e as respostas Th1, IFN -  $\gamma$  e IgG2, com a proteção, na LV (El Amin et al., 1986; Gascan et al., 1991; Ellassad et al., 1994). A estimulação de IgM, IgE e IgG4 nesta doença está associada com uma resposta Th2 e aumento de suscetibilidade (Ellassad et al., 1994; Chatterjee et al., 1998; Passos et al., 2000). A persistência de IgM, IgE e IgG4 específicas para *Leishmania*, após a terapia, estão correlacionadas com a persistência da LV e a resolução da infecção corresponde a um declínio significativo de IgE e IgG4 (Chatterjee et al., 1998; Passos et al., 2000).

Em um estudo realizado por Nunes (2001) em 34 pacientes com LCL e em 20 pacientes com LM foi observada uma elevação dos níveis séricos de IgG1 e IgG4 específicas para antígenos de promastigotas de *Leishmania* e de IgE total na maioria dos indivíduos estudados. Estes pacientes apresentavam um perfil de citocinas, de classes e subclasses de imunoglobulinas associadas à resposta celular de perfil misto (Th1/Th2), o que poderia estar relacionado com a persistência da infecção em alguns desses pacientes.

#### **1.4 IgE na LTA**

A produção de anticorpo IgE, geralmente está associada com infecções helmínticas e alergias, mas também tem sido detectada em infecções com microrganismos intracelulares. Os anticorpos IgE são produzidos na resposta imune Th2 e a presença destes tem sido utilizada como marcador de diagnóstico ou prognóstico em doença como toxoplasmose, malária e LV (Wong et al., 1993; Perlmann et al., 1997; Atta et al., 1998; Sousa - Atta et al., 2002).

A IgE é o isótipo que contém a cadeia pesada  $\epsilon$ , e de todos os isótipos de Ig, a IgE é o mais eficiente na ligação aos receptores Fc dos mastócitos e na

ativação dessas células (Abbas et al., 2012). A IgE desenvolve sua função biológica após a fixação ao receptor de alta afinidade (FcεRI) em mastócitos, basófilos e células de Langerhans. A presença de anticorpos IgE em pacientes com LCL pode ser interpretada como um mecanismo de proteção para impedir a infecção cutânea e para modular a resposta inflamatória da pele mediada por citocinas dos linfócitos do tipo Th1 (Sousa - Atta et al., 2002).

Vouldoukis et al., (1995) demonstraram que a ligação de CD23, em macrófagos humanos é um indutor forte de óxido nítrico (NO), impedindo o crescimento de *Leishmania*. Durante a ativação de macrófagos, o CD23 é clivado por proteólise e eliminado da célula como uma forma solúvel (sCD23). O receptor CD23 é também relacionado com a captação e apresentação de antígenos. No estudo de Cabrera et al., (2003) foi analisado a relação entre sCD23, NO e IgE total em pacientes com LCL, a fim de compreender o papel da IgE, CD23 e fatores pró-inflamatórios na proteção ou patogênese desses pacientes. Foi demonstrado que essa relação tende a eliminar ou levar a cronicidade da doença, isso dependendo das citocinas locais e outros fatores indefinidos.

No estudo de Rodrigues et al., (1996) em pacientes com LCL, foi observado um padrão misto Th1 e Th2 de resposta, e também detecção de anticorpos IgE. Souza et al., (2005) em pacientes nos estágios iniciais de LCL, demonstraram maior produção de IL - 10 em detrimento de IFN- $\gamma$ , ocorrendo troca deste perfil ao longo da evolução da doença, onde citocinas proinflamatórias passam a ser predominantes. Por outro lado, em pacientes com LM há uma mistura de perfil de resposta Th1 e Th2, antes e após o tratamento (Amato et al., 2008). Na pesquisa de O'Neil et al., (1993), eles relataram que pacientes com um maior tempo de evolução da doença e em pacientes com a forma LM, os níveis de IgE eram mais altos.

Estudos feitos por Lynch et al., (1982) relatam que os indivíduos com LTA que produzem IgE durante a infecção tendem a não responder ao teste intradérmico de Montenegro e que esses indivíduos não reatam mesmo após tratamento, têm mais chances de não obter a cura clínica ou de sofrerem recidivas.

Esses dados demonstram a complexidade da resposta imune humoral em pacientes com LTA, se a presença de IgE pode constituir um bom ou mal

prognóstico, mais investigações se fazem necessárias para definir o seu papel na LTA, tanto na forma LCL quanto na LM.

## 2 JUSTIFICATIVA

---

A análise de anticorpos anti - *Leishmania* permite avaliar o curso evolutivo da infecção, e pode fornecer dados sobre as características da resposta imune. Variados perfis e níveis de imunoglobulinas específicas para *Leishmania* têm sido detectados em pacientes com LTA ou LV, parecendo refletir não só a carga parasitária, mas também a espécie envolvida, o tempo de infecção e fatores intrínsecos do próprio hospedeiro (Gutierrez et al., 1991). A avaliação de IgE nos plasmas de pacientes pode constituir uma alternativa valiosa para identificar um fator de prognóstico da LTA.

A caracterização das manifestações clínicas dos pacientes com LTA, bem como a elaboração de prognósticos precisos e terapia adequada são necessários para evitar a progressão da doença e o aparecimento de novas lesões (Bacha et al., 2011). Este trabalho é de grande importância, pois tem como objetivo avaliar se anticorpos IgE anti - *Leishmania* podem ser um biomarcador de prognóstico, contribuindo com informações que poderão auxiliar em um melhor entendimento da imunopatogênese e no acompanhamento do tratamento dos pacientes com LTA em suas diversas formas clínicas.

## **3 OBJETIVOS**

---

### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar se anticorpos IgE anti - *Leishmania* podem ser um biomarcador de prognóstico na LTA.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Padronizar um Ensaio Imunoenzimático para detecção de IgE específica para *L. (V.) braziliensis*.
- Detectar anticorpos IgE específicos para *L. (V.) braziliensis* em amostras plasmáticas de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA e associar com parâmetros clínicos e tratamento.

## **4 MÉTODOS**

---

### **4.1 Local do estudo e aspectos éticos**

Este estudo foi realizado, no laboratório de Imunobiologia das leishmanioses do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP – UFG). Este projeto é associado ao Banco Imunológico de Leishmanioses da Região Centro-Oeste (Leishbank) e projetos associados, com protocolos aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas (HC – UFG), Proc. Nº 125/2004 (ANEXO 1). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2) foi assinado pelos doadores de sangue.

### **4.2 Amostragem**

As amostras de plasmas (n = 40) utilizadas para este estudo retrospectivo, foram de pacientes atendidos no ambulatório do Centro de referência de leishmanioses do Estado de Goiás, no Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad (HDT/HAA), no período de 2009 a 2012, sob a coordenação da infectologista Dr<sup>a</sup> Ledice Inácia Araújo Pereira, estocadas na soroteca do *Leishbank*. As amostras de controle sadios (n = 20) foram obtidas do Banco de Sangue do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH). Foram incluídos na pesquisa pacientes que confirmaram o diagnóstico de LTA, após realizações de exames clínicos e pelo menos dois exames laboratoriais positivos como Intradermoreação de Montenegro (IDRM), reação de imunofluorescência Indireta (IFI), análise histopatológica (AH) com detecção de formas amastigotas confirmada por imunoistoquímica. No presente trabalho também foram utilizadas 50 amostras de soros de pacientes com outras doenças (Bastomicose, Malária, Leishmaniose Visceral, Doença de Chagas e Toxoplasmose).

#### **4.3 Preparação do extrato antigênico de *L. (V.) braziliensis* para execução dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA)**

Parasitas da espécie *L. (V.) braziliensis* foram cultivados *in vitro* em meio Grace completo (Grace's Insect Medium, Sigma Chemical Co., St Louis, MD, EUA), pH 5,8, suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cripion, Andradina, SP, Brasil) inativado, 2 mM de L - glutamina (Sigma), 100 U/ml de penicilina (Sigma) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma). As culturas foram mantidas em estufa à 26° C e o repique dos parasitos, realizado periodicamente. Na fase exponencial, os parasitos foram lavados três vezes e ressuspensos em 1 mL de PBS (salina tamponada com fosfato). Os parasitos foram contados em hematocitômetro, ajustados em PBS para uma concentração de  $5 \times 10^8$  parasitos/mL e armazenados a - 120°C (nitrogênio líquido). Para a sensibilização das placas de ELISA (Corning Incorporated, Costar 3590), os parasitos eram, então descongelados e submetidos a cinco séries consecutivas de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho Maria a 37°C, para romper os parasitos e liberar as proteínas antigênicas. Para evitar degradações proteolíticas durante a preparação e a utilização do antígeno, foi utilizado um coquetel de inibidores de proteases (Sigma).

#### **4.4 Avaliação do reconhecimento do extrato antigênico de *L. (V.) braziliensis* por anticorpos IgE e IgG de pacientes com LTA**

Inicialmente, foi realizada a padronização da reação para detecção de anticorpos da classe IgE específicos para *Leishmania*, utilizando anticorpos anti - IgE marcados com peroxidase (Sigma). Foram utilizadas três amostras de plasma controles positivos e duas amostras de plasma controles negativos, estocadas na soroteca do *Leishbank*. Os plasmas controles positivos e negativos foram testados nas diluições 1/10, 1/20, 1/50 e 1/100 e o conjugado (anti - IgE marcado com peroxidase) nas diluições 1/100/ 1/250, 1/500 e 1/1000. As placas de ELISA foram sensibilizadas com 50 µL/poço da solução de extrato antigênico de *L. (V.) braziliensis* ( $5 \times 10^6$  parasitos/poço) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,06 M. Após 18 horas de incubação, as placas foram bloqueadas com PBS contendo 3 % de leite desnatado em pó, durante 2 horas.

Em seguida, as amostras foram adicionadas nas diluições de plasma 1/10, 1/20, 1/50 e 1/100 em solução bloqueio e incubadas a 4°C, por 2 horas. As placas foram lavadas com solução PBS Tween, o anticorpo anti – IgE - peroxidase nas diluições de 1/100, 1/250, 1/500 e 1/1000 foi adicionado em solução de bloqueio e após incubação por 1 hora, as placas foram lavadas. Em seguida, foi adicionada a solução de TMB (Thermo scientific) reveladora, seguida de incubação por 20 minutos e a reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. A mensuração da Densidade Óptica foi feita em leitora de ELISA, com filtro de 450 nm. Após análise estatística, foi definido que a concentração de plasma e de conjugado que melhor discriminava os controles positivos dos controles negativos era 1/20 e 1/100, ( $r^2 > 0,9$ ). Em seguida, foi realizado o ELISA com 40 amostras de plasma na diluição de 1/20 e o conjugado foi diluído a 1/100.

Para detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas G (IgG) específicas para extrato total de *L. (V.) braziliensis*, placas de ELISA foram sensibilizadas com 50 µL da solução total de *L. (V.) braziliensis* ( $5 \times 10^6$  parasitos/poço) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,06 M. Após incubação de 16 horas a 4°C, as placas foram bloqueadas com PBS contendo soro fetal bovino (SFB) a 2,5% (PBS/SFB); em seguida, foram adicionados os plasmas dos pacientes ( $n = 40$ ) diluídos 1/50 em PBS - SFB 1%. Após incubação de 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas com solução PBS Tween 0,05%. Em seguida, foi adicionado conjugado anti-IgG total humana marcado com peroxidase (Bio - Rad) diluído em PBS-SFB 1% (1/2000) e após incubação de 1h a 37°C, as placas foram lavadas com PBS-T20. A reação foi revelada com solução de TMB e a reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. A mensuração da Densidade Óptica foi feita em leitora de ELISA, com filtro de 450 nm.

#### **4.5 Análise estatística**

Os dados do ELISA estão expressos em Índice de Reatividade (IR), que foi calculado pela fórmula  $IR = \text{média dos valores da D.O. de cada amostra (em duplicata)} / \text{cut off}$ , onde o *cut off* da placa foi estabelecido pela média da D.O. de seis amostras negativas (em duplicata) mais um desvio padrão. Amostras  $\geq 1,0$  foram consideradas positivas. Os resultados foram avaliados pelo programa

estatístico Prisma. Os dados foram compilados em planilhas no Microsoft® Office Excel® 2013. Para comparação entre variáveis contínuas (médias de idade) com distribuição normal foi utilizado o Teste t, médias e medianas com distribuição não normal (medianas); foram comparadas utilizando o Teste Mann-Whitney; as variáveis categóricas foram analisadas pelo Teste Exato de Fischer. Foi considerado para todos os testes um nível de significância  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1. Padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando extrato antigênico de *L. (V.) braziliensis* para detecção de IgE específica nos plasmas de pacientes com LTA.

Inicialmente, foi feita a padronização do ELISA para detecção de anticorpos IgE específicos para o extrato antigênico de *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizadas três amostras de plasma controles positivas e duas amostras controles negativas, nas diluições de 1/10, 1/20, 1/50 e 1/100 e o anticorpo anti - IgE - peroxidase, nas diluições de 1/100, 1/250. Observando as figuras 3 e 4 verificamos que o plasma na diluição de 1/20 e anticorpo anti - IgE marcado com peroxidase na concentração de 1/100, permitiram a melhor discriminação entre as amostras reagentes e não reagentes (Figura 4).

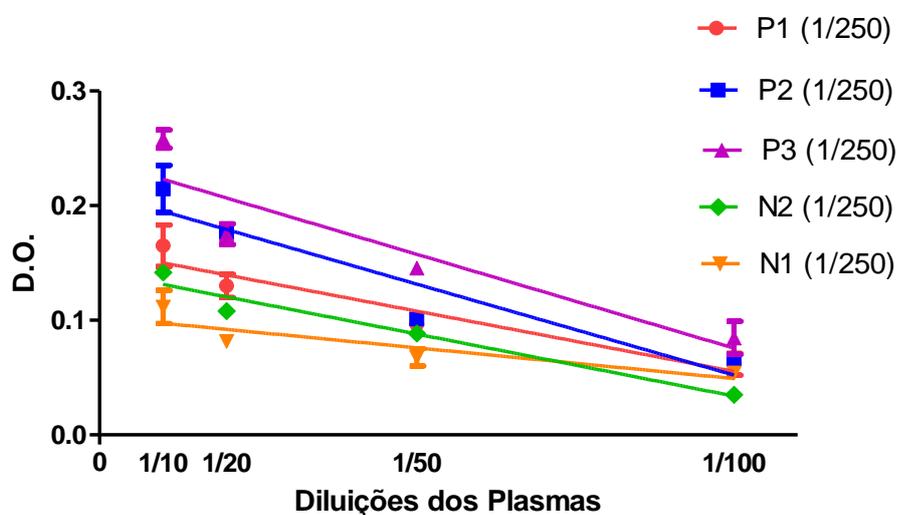
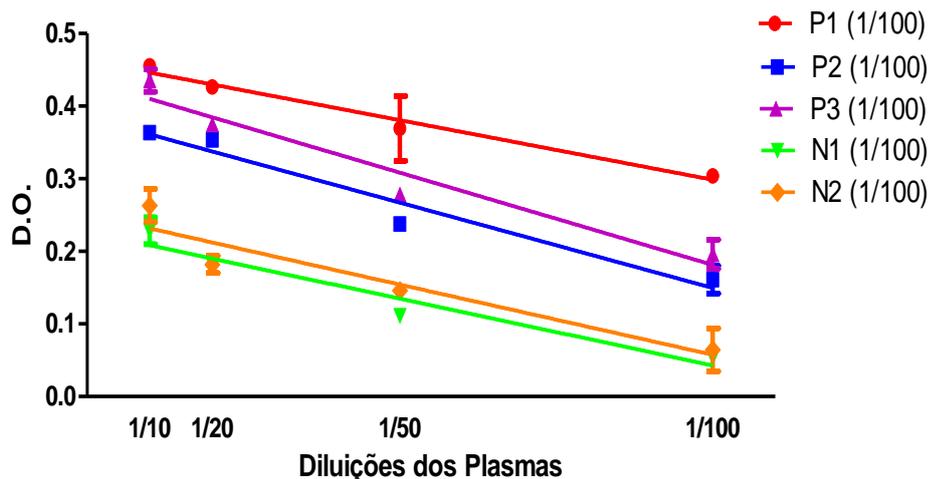


Figura 3. Ensaio imunoenzimático para detecção de IgE específica para *L.(V.) braziliensis* (conjugado utilizado na diluição de 1/250). P1, P2 e P3: plasmas controles positivos de pacientes com LTA; N1 e N2: controles negativos, plasmas de doadores sadios nas diluições de 1/10, 1/20, 1/50 e 1/100.



**Figura 4. Ensaio imunoenzimático para detecção de IgE específica para *L.(V.) braziliensis* (conjugado utilizado na diluição de 1/100).** P1, P2 e P3: plasma controle positivo de pacientes com LTA; N1 e N2: controles negativos, plasma de doadores sadios nas diluições de 1/10, 1/20, 1/50 e 1/100.

## 5.2 Características dos pacientes com LTA atendidos no ambulatório de endemias do hospital Anuar Auad do estado de Goiás

Para avaliar a produção de IgE específico para *L.(V.) braziliensis* nos pacientes com LTA, foram avaliados 40 pacientes com as formas clínicas LCL e LM, atendidos no ambulatório de endemias do Hospital Anuar Auad (HDT/GO) na cidade de Goiânia, estado de Goiás, entre 2009 e 2012. Destes pacientes, 27 eram do sexo masculino e 13 do sexo feminino. A idade dos pacientes na forma clínica LCL variou entre 18 a 65 anos (média  $\pm$  DP: 36,3  $\pm$  14,8) e na forma clínica LM de 25 a 61 anos (média  $\pm$  DP: 42,8  $\pm$  10,4). Os pacientes com a forma clínica LCL apresentavam de uma a 20 lesões (mediana: 2), o tamanho das lesões variou entre 0,2 a 7 cm (média  $\pm$  DP: 2,0  $\pm$  1,6). O tempo de lesões dos pacientes com a forma clínica LC variou de 0,5 a 12 meses (mediana: 4) e dos com a forma clínica LM variou de 0,5 a 120 meses (mediana: 5,5). Para o diagnóstico desses pacientes foram utilizados os dados clínicos e laboratoriais. Os testes laboratoriais realizados foram análise histopatológica (AH), Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e Imunofluorescência indireta (IFI). Na IDRM, o paciente foi considerado reator quando a endureção foi acima de 5 mm e a IFI foi considerada positiva quando o título era acima de 40 (Tabela 1).

No presente trabalho também, foi realizada a detecção de IgG para *L.(V.) braziliensis* nos 40 pacientes.

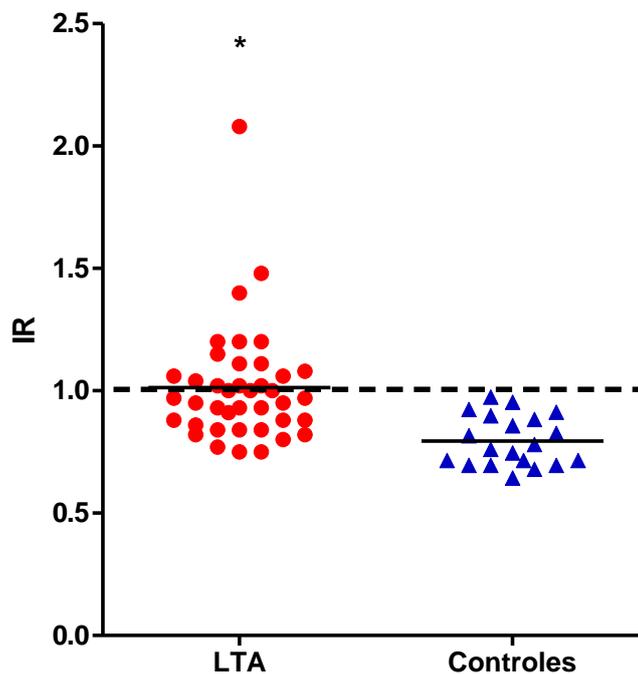
**Tabela 1 – Características dos pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada e Leishmaniose Mucosa**

Características	Pacientes LCL (n = 27)	Pacientes LM (n = 13)	Total (n = 40)
<b>Sexo</b>			
Masculino	21	10	27
Feminino	06	03	13
<b>Idade (anos)</b>			
Média ± DP	36,3 ± 14,8	42,8 ± 10,4	38,9 ± 13,5
(mín-máx)	(18 – 65)	(25 – 61)	(18 – 65)
<b>Número de lesões</b>			
Mediana	2	-	2
(mín-máx)	(1 – 20)	-	(1 – 20)
<b>Tamanho da lesão (cm)</b>			
Média ± DP	2,0 ± 1,6	-	2,0 ± 1,6
(mín-máx)	(0,2 – 7)	-	(0,2 – 7)
<b>Tempo de lesões (meses)</b>			
Mediana	4	12	5,5
(mín-máx)	(0,5 – 12)	(0,7 – 120)	(0,5 – 120)
<b>Testes Diagnósticos</b>			
IDRM (positivo)	78,2% (18/23)	100% (10/10)	84,8% (28/33) <sup>a</sup>
AH (positivo)	100% (24/24)	100% (10/10)	100% (34/34) <sup>b</sup>
IFI (reator)	52,3% (11/21)	60% (6/10)	54,8% (17/31) <sup>c</sup>
ELISA (IgG)	60% (24/40)	27,5% (11/40)	87,5% (35/40) <sup>d</sup>

LCL: leishmaniose cutânea localizada; LM: leishmaniose mucosa. Os valores são média ± desvio padrão (mínimo e máximo) e mediana (mínimo e máximo); <sup>a</sup> IDRM: % positivo/ total exames realizados; <sup>b</sup> AH: % de exames com presença de amastigota/ total de exames realizados; <sup>c</sup> IFI: % reatores/ total exames realizados; <sup>d</sup> IgG: % reatores/ total de exames realizados.

### 5.3 Avaliação do reconhecimento de extrato antigênico de *L. (V.) braziliensis* por anticorpos IgE de pacientes com LTA

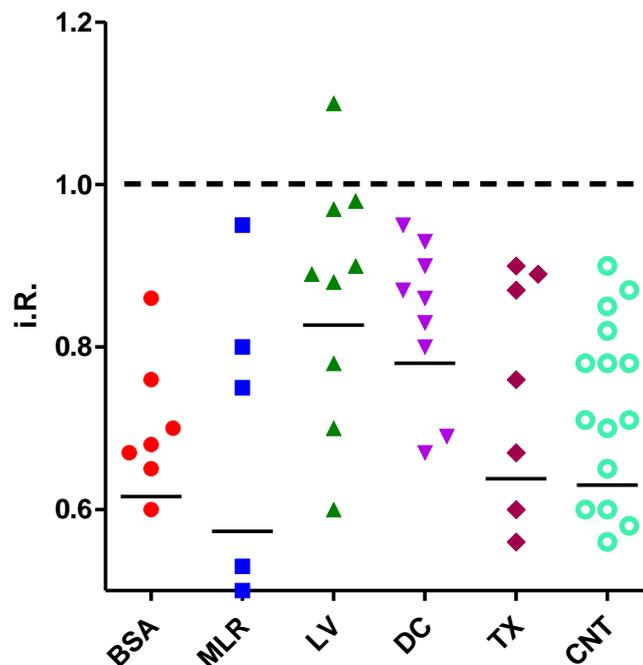
A sensibilidade da reação foi calculada utilizando 40 amostras de plasma de pacientes com as formas clínicas LCL e LM de LTA. Das 40 amostras de plasma de pacientes com LTA, 16 (40%) foram reagentes (Figura 5), apresentando uma diferença de reatividade ( $p = 0,0001$ ) com os plasmas de controles sadios. A sensibilidade apresentada pelo ELISA foi, portanto, de 40%.



**Figura 5. Detecção de anticorpos IgE específicos para antígenos de *L. (V.) braziliensis* no plasma de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana.** Amostra positiva para LTA ( $n = 40$ ) e controles negativas para LTA ( $n = 20$ ). Os anticorpos foram detectados por ELISA. Cada ponto indica o índice de reatividade (IR) de cada amostra.  $IR \geq 1$ : soro reagente,  $IR < 1$ : soro não reagente. (—) Mediana ( - - - ) IR. Teste Mann Whitney ( $p = 0,0001$ ).

#### 5.4 Avaliação da especificidade do ELISA utilizando amostras de pacientes sadios e de pacientes com outras doenças

Para avaliar a especificidade do ELISA utilizamos o extrato total de *L. (V.) braziliensis* na realização da pesquisa de IgE nos soros de pacientes com blastomicose (n = 10), malária (n = 10), leishmaniose visceral (n = 10), doença de chagas (n = 10), toxoplasmose (n = 10) e soros de pacientes sadios (controle negativo) (n = 20). Nessa análise, o extrato total de *L. (V.) braziliensis* apresentou reatividade cruzada apenas com uma amostra de paciente com LV (10%) (Figura 6). A especificidade foi de 98,33%.



**Figura 6. Detecção de anticorpos IgE para antígenos de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* em amostras séricas de pacientes sadios e pacientes com outras doenças.** Amostra de pacientes com Blastomicose Sul Americana (BSA) (n = 10), malária (MLR) (n = 10), leishmaniose visceral (LV) (n = 10), Doença de Chagas (DC) (n = 10), Toxoplasmose (TX) (n = 10) e pacientes saudáveis de banco de sangue (controle negativo) (CNT) (n= 20), foram testados contra os antígenos do extrato total de *L.(V.) braziliensis*. O *cut-off* foi calculado individual em cada placa e convertido para o índice de reatividade (I.R.) onde IR  $\geq$  1: soro reagente, IR <1: soro não reagente (SNR). As linhas sólidas representam as medianas e a linha tracejada o I.R.



## 5.6 Avaliação da associação entre os níveis de IgE e da intradermorreação de Montenegro

Em seguida, foi realizada a avaliação entre os níveis de IgE e da IDR. Dos 16 pacientes reagentes para IgE que realizaram teste de IDR, nove foram positivos e quatro negativos para IDR; e dos 20 pacientes não reagentes para IgE que realizaram o teste de IDR, 15 pacientes eram positivos e cinco negativos na IDR. Embora tenha sido detectada uma tendência de valores mais elevados na IDR no grupo de pacientes contendo IgE específicas para os antígenos de *Leishmania*, não foi demonstrada diferença significativa (Fig. 8A). A análise, dividindo os grupos quanto à positividade ou não na IDR, confirmou estes resultados (Fig. 8B). Neste caso, dos 22 pacientes positivos na IDR que foram submetidos à análise de IgE, oito foram reagentes e 14 não foram reagentes para IgE; dos seis pacientes com IDR negativa que realizaram a análise de IgE, três eram reagentes e três não reagentes para IgE.





## 5.8 Avaliação da associação entre os níveis de IgE e a cura clínica em pacientes com LTA

Os pacientes com LTA, submetidos ao tratamento, foram analisados quanto à cura clínica e a resposta IgE. Dos pacientes com a forma clínica LCL que foram reagentes para IgE (n = 12), nove destes pacientes apresentaram cura clínica após o primeiro ciclo de tratamento e três não apresentaram cura clínica. Entre os pacientes que não foram reagentes para IgE (n = 15), 10 pacientes mostraram cura clínica após o primeiro ciclo de tratamento e 5 não apresentaram a cura clínica. Todos os pacientes com a forma clínica LM que foram reagentes para IgE (n = 4) apresentaram cura clínica, enquanto entre os pacientes não reagentes para IgE (n = 9), sete pacientes apresentaram a cura clínica e dois não. Não foi detectada diferença significativa entre os grupos (Tabela 2). Dos oito pacientes com a forma clínica LCL que não apresentaram cura clínica, três receberam um novo esquema terapêutico e cinco não voltaram para seguimento ou acompanhamento, assim como os dois pacientes com a forma clínica LM que não apresentaram cura clínica também não voltaram ao ambulatório de endemias do Hospital Anuar Auad (HDT/GO).

**Tabela 2 – Avaliação do desfecho clínico após tratamento em pacientes com LTA IgE reagentes e IgE não reagentes**

Forma Clínica		Cura Clínica	Não Cura Clínica	Total
LCL	IgE reagente	09	03	12
	IgE não reagente	10	05	15
	Total	19	08	27
LM	IgE reagente	04	00	04
	IgE não reagente	07	02	09
	Total	10	02	13

LCL: leishmaniose cutânea localizada; LM: leishmaniose mucosa. Teste Exato de Fisher.

## 6 DISCUSSÃO

---

A presença de IgE tem sido associada as reações alérgicas e às helmintíases e, mais recentemente foi detectada em protozoonoses e infecções virais (Nascimento et al., 2006). A análise de anticorpos anti - *Leishmania* que ocorrem durante a infecção são importantes para a determinação da evolução ou controle da doença, pois fornecem dados sobre as características de sua resposta imune. A infecção por *Leishmania* normalmente, leva à indução de resposta imune complexa, caracterizada tanto por reações mediadas por células como pela produção de anticorpos.

Neste trabalho foi padronizado um ELISA para a detecção de anticorpos IgE específicos para extrato total de *L. (V.) braziliensis*, desde que esta é a espécie predominante no Brasil. O ELISA foi escolhido por ser uma técnica, altamente sensível (Gontijo e Carvalho, 2003; Veja - Lopés, 2003; Elmahallawy et al., 2014). Após escolha da técnica a ser utilizada, foi realizada a sua padronização, utilizando extrato antigênico de *L. (V.) braziliensis* para detecção de IgE específica nos plasmas de pacientes com LTA (Fig. 5 e 6). Foi observado que a concentração do plasma 1/20 e do conjugado (anticorpo anti - IgE marcado com peroxidase) a 1/100 permitiram melhor discriminação entre as amostras reagentes e não reagentes (Fig. 5 e 6).

No estudo de Souza et al., (2005), ao avaliar o perfil de isótipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na LTA, observaram que 97%, 94,6%, 57,5% e 21,5% das amostras testadas apresentaram anticorpos anti - *Leishmania* das classes IgE, IgG, IgA e IgM, respectivamente e, os perfis das subclasses demonstraram, IgG1>IgG3>IgG2>IgG4. Os dados obtidos no presente projeto quanto a presença de IgG específica para antígenos de *L. (V.) braziliensis* corroboram estes trabalhos, uma vez que a reatividade observada foi de 87,5% (Tabela 1). Junqueira Pedras et al., (2003) avaliaram a eficiência da detecção de IgG e suas subclasses usando antígenos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* para o diagnóstico da LM. Concluíram que a sensibilidade e a

especificidade variam amplamente e encontraram níveis de IgG total, IgG1 e IgG3 elevados em pacientes com LM e LC.

Das 40 amostras de pacientes com as formas clínicas LCL e LM de LTA atendidos no ambulatório de endemias do Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad (HDT/HAA), 27 pacientes eram do sexo masculino e 13 do feminino, e apresentavam idades entre 18 e 65 anos, esses dados estão de acordo com os dados do Ministério da saúde, onde a maioria dos casos de LTA no Brasil ocorre no sexo masculino (Brasil, 2010). A maioria dos casos ocorre na idade adulta, com a média 45 anos, correspondendo o momento mais produtivo da vida dos pacientes (Nogueira e Sampaio, 2001; D'Ávila et al., 2004).

Dos pacientes analisados, 27 apresentavam a forma clínica LCL e 13 a forma clínica LM (Tabela 1). Os 27 pacientes com a forma clínica LCL relataram ter de uma a 20 lesões. O tamanho das lesões destes pacientes variou de 0,2 a 7 cm. No estudo de Oliveira et al., (2010) eles mostraram que os pacientes com lesões maiores geralmente são mais velhos e apresentam níveis mais elevados de TNF, o que indica que existe uma associação positiva entre os níveis de TNF, o tamanho da lesão e a idade dos pacientes. Além disso, no estudo de Antonelli et al., (2005) eles mostraram que grandes lesões de LCL estavam correlacionadas com uma frequência mais alta de linfócitos produtores de citocinas inflamatórias (IFN -  $\gamma$  e TNF -  $\alpha$ ) em resposta a antígeno solúvel de *Leishmania*. No presente trabalho o tempo de lesão dos pacientes variou de 0,5 a 12 meses nos pacientes com a forma clínica LCL e de 0,7 a 120 meses para os pacientes com LM. Azulay e Salgado (1966) relataram que a forma clínica LCL surge entre 18 dias a três meses após infecções pelo parasito.

A positividade de IDRM, a reatividade da IFI e no ELISA (IgG total) foi de 84,8%, 54,8% e 87,5%, respectivamente, nas amostras avaliadas neste trabalho. Oliveira et al., (2010) detectaram positividade de 58,8% para a IDRM e 47,3% para IFI. Uma positividade similar também foi detectada por Ferreira et al., (2006), que foi de 64,4% para IDRM, 58,1% para IFI e 85% para o ELISA. Neste estudo, todos os pacientes com LM apresentaram, na IDRM, uma endureção maior ou igual a 10 mm, confirmando os relatos do Ministério da Saúde, em que os pacientes com LM apresentam uma IDRM exacerbada (Brasil, 2009). A IFI apresenta resultados variáveis na LTA e não há correlação entre os níveis de anticorpos IgG circulantes e o estágio da doença (Reis et al.,

2008). Sua sensibilidade é em torno de 50% a 70% (Mendonça et al., 1988; Brito et al., 2000), como detectado no presente trabalho.

A mensuração dos níveis de anticorpos anti - *Leishmania* tem sido usada como diagnóstico e têm mostrado correlação com a gravidade da doença (Castellano et al., 2009). A concentração de anticorpos pode variar de acordo com a carga parasitária (Gutierrez et al., 1991), duração da infecção (Pereira et al., 2012), espécies de *Leishmania* e fatores do hospedeiro (Miles et al., 2005). Neste estudo a detecção de IgE específica para antígenos de *L. (V.) braziliensis* ocorreu em 16 (40%) dos 40 pacientes analisados, 12 (44,4%) pacientes apresentavam a forma clínica LCL e quatro (30,7%) LM, não foi observado diferença entre os dois grupos (Fig. 6). Estes dados corroboram o trabalho de Sousa - Atta et al., (2002) onde dos 45 pacientes com LCL analisados, em 18 (40%) foram detectadas IgE anti - *Leishmania*. Entretanto, no nosso trabalho para que fosse possível observar diferenças entre as formas clínicas, o número de pacientes com LM deveria ser maior. Anam et al., (1999) demonstraram em pacientes com LV, que a pesquisa de IgE apresentou 98% de especificidade e 40% de sensibilidade. Estes dados concordam com os obtidos neste trabalho (Fig 6 e 7).

Para Ndao (2009) a reatividade cruzada observada entre os antígenos de leishmânia e soros de pacientes com outras doenças é geralmente causado por determinantes antigênicos comuns a esses patógenos. No presente trabalho analisamos a especificidade do ELISA utilizando o extrato total de *L. (V.) braziliensis* para a pesquisa de IgE nos plasmas de pacientes com blastomicose, malária, leishmaniose visceral, doença de chagas, toxoplasmose e de doadores sadios. Foi observada reatividade cruzada apenas com 10% de amostras de pacientes com LV, com especificidade foi de 98,33% (Fig. 7).

No presente trabalho, foi avaliada a associação entre os níveis de IgE e a IDRM, pois a presença da IgE representa uma resposta imune do tipo Th2 que pode inibir a resposta imune celular. Por outro lado, também pode ativar macrófagos contra os parasitos, impedindo assim o crescimento do parasito (Vouldoukis et al., 1995). Observou-se que embora tenha sido detectada uma tendência de valores mais elevados na IDRM no grupo de pacientes que apresentavam IgE específicas para os antígenos de *Leishmania* (Fig. 8A e 8B),

não foi demonstrada diferença significativa em relação aos valores de IDRMs dos pacientes não reagentes para IgE. Esses resultados aparentemente divergem daqueles do trabalho de Souza - Atta et al., (2002), em que demonstraram que a IgE anti - *Leishmania* estava presente na maioria das amostras de pacientes com LCL e existia uma correlação positiva entre os níveis de IgE com a IDRMs. Esta diferença provavelmente se deu devido ao número de amostras reduzido.

A IgE desenvolve a sua função biológica após a fixação ao receptor (FC $\epsilon$ RI) em mastócitos, basófilos e células de Langerhans, e a presença de anticorpos IgE em pacientes com a forma clínica LCL pode ser interpretada como um mecanismo de proteção controlando a infecção para impedir a sua propagação na derme e para modular a resposta inflamatória da pele mediada por citocinas Th1. Em pacientes com a forma clínica LCL, houve uma relação inversa entre IgE no soro e no número de úlceras cutâneas de *Leishmania* (Sousa - Atta et al., 2002). No presente trabalho, embora tenha sido detectado um maior número de lesões nos pacientes não reagente para IgE, não foi atestada diferença significativa em relação ao grupo de pacientes IgE reagente (Fig. 9). Quanto ao tempo de lesão também não foi observado diferença significativa em pacientes com LCL e devido ao pequeno número de amostras de pacientes com LM reagentes para IgE, não foi possível fazer análise de associação entre nível de IgE e o tempo de lesão.

Para Fagundes - Silva et al., (2012) na LTA é difícil fazer um prognóstico e uma avaliação dos níveis de anticorpos anti - *Leishmania* é de fundamental importância para o acompanhamento clínico pós-terapia. Mendonça et al., (1988) relata que após o tratamento a diminuição dos níveis dos anticorpos em pacientes com LTA, pode ser uma forma de monitorar a cura pós-terapêutica, demonstrando controle da infecção. Sousa - Atta et al., (2002) relataram que a queda do título de IgE não estava relacionada com a cura da doença, uma vez que houve uma diminuição do mesmo em pacientes em que houve falha terapêutica. Em quatro casos em que os títulos de IgE permaneceram elevados após a terapia, três apresentaram uma cura completa e um, uma falha. Para 27 pacientes não tratados com a forma clínica LCL, não reagentes para anticorpos IgE antes da terapia, os níveis de anticorpos não se alteraram após o uso do antimonial. No presente trabalho, os pacientes submetidos ao tratamento foram

analisados quanto à cura ou não cura clínica e a resposta a reatividade de IgE ao diagnóstico, não sendo detectada diferença significativa entre os grupos que foram divididos conforme a forma clínica. Foram oito pacientes com a forma clínica LCL que não mostraram cura clínica desses, três receberam um novo ciclo de tratamento e cinco não voltaram para fazer novo ciclo de tratamento; enquanto os três pacientes com a forma clínica LM, que não tiveram cura clínica, também não voltaram. No entanto, não avaliamos o acompanhamento para IgE nos pacientes que retornaram. Pereira et al., (2012) relatam que a presença dos anticorpos após terapia medicamentosa pode indicar a persistência do parasito, sendo um fator preditivo de recorrência da LTA. Segundo Brasil (2006) de 3% a 5% dos pacientes no Brasil com a forma clínica LCL evoluem para forma clínica LM. Mais estudos com um número de pacientes maior são necessários para que seja possível determinar se a IgE favorece a infecção ou se é um fator de proteção.

A patogênese do envolvimento da mucosa durante a infecção com *L. (V.) braziliensis* permanece obscuro, mas certamente é dependente de fatores do parasito e do hospedeiro (Ellasad et al., 1994; Saravia et al., 1998). No trabalho de Cabrera et al., (2003), pacientes com LM apresentaram maior produção de sCD23 e NO com níveis significantes de IgE específica. A ligação cruzada de CD23 leva à indução da síntese de óxido nítrico (NO) em monócitos humanos. Assim uma vez que a IgE se liga a CD23, a IgE pode ser responsável pela produção de NO. Geração mediada por CD23 de NO é conhecida por esta envolvida na produção de TNF -  $\alpha$ , que está aumentada em pacientes com a forma clínica LM (Castés et al., 1993). Pacientes com LTA que apresentaram e os que não apresentam anticorpos IgE específicos para *L. (V.) braziliensis* devem ser melhor analisados, com um número maior de amostras, mais estudos são necessários para uma melhor avaliação do papel da IgE em pacientes com as formas clínicas LCL e LM, assim certificando melhor o seu papel no prognóstico.

## **7 CONCLUSÕES**

---

✓ Verificamos após padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando extrato antigênico de *L. (V.) braziliensis* para detecção de IgE específica nos plasmas de pacientes com LTA, que o plasma na diluição de 1/20 e anticorpo anti - IgE marcado com peroxidase na concentração de 1/100, permitiram a melhor discriminação entre as amostras reagentes e não reagentes.

✓ A detecção de IgE específica para *L. (V.) braziliensis* ocorreu em 40% dos pacientes com LTA, 30% dos pacientes com LCL e em 10% dos pacientes com LM.

✓ Foi investigado se havia uma correlação entre a reatividade de IgE e o número de lesões em pacientes com a forma clínica LCL, e não foi observado diferença em relação ao grupo IgE reagente.

✓ Dos pacientes com LTA submetidos ao tratamento foram analisados quanto à cura clínica e a resposta IgE, não sendo detectada diferença entre os grupos.

✓ Um aumento do número de amostras de pacientes com as formas clínicas LCL ou LM é necessário para melhorar a acurácia dos resultados, assim podendo avaliar se anticorpos IgE anti - *Leishmania* podem ser um biomarcador de prognóstico na LTA.

## REFERÊNCIAS

---

- ABBAS, A. K. et al. *Imunologia Celular e Molecular*, 7<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- AFRIN, F.; ALI, N. Isotype profiles of *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice: preferential stimulation of IgG2a/b by liposome-associated promastigote antigens. *The Journal of parasitology*, v. 84, p. 743 - 8, 1998.
- AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. *Acta tropica*, v. 105, p. 1 - 9, 2008.
- ANAM, K. et al. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian Lala-azar patients after chemotherapy. *Infect. Immun*, v. 67, p. 663 - 669, 1999.
- ANDRADE - NARVAEZ, F. J. et al. *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo*, v. 47, p. 191 - 194, 2005.
- ANTONELLI, L. R. et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett*, v. 101, p. 226 - 230, 2005.
- ASHFORD, R. W. The leishmanioses as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, v. 30, p. 1269 - 1281, 2000.
- ATTA, A. M. et al. Anti-leishmanial IgE antibodies a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 59, p. 426 - 430, 1998.
- AZULAY, R. D.; SALGADO, U. Surto epidêmico da leishmaniose tegumentar em para-queistas do Exército no Amazonas. *Med Cutânea*, v. 1, p. 347, 1966.
- BACHA, H. A. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brasil. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 105, p. 173 - 178, 2011.
- BARROSO - FREITAS, AP. et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 103, p. 383 - 9, 2009.
- BASANO, S. D. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle American cutaneous leishmaniasis: *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, p. 328 - 337, 2004.
- BIRD, P. et al. The separation of human serum IgG into subclass fractions by immunoaffinity chromatography and assessment of specific antibody activity. *J. Immunol. Methods*, p. 71 - 97, 1984.

BOGDAN, C. et al. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *J. Exp. Med.* v. 191, p. 2121 - 2129, 2000.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Vigilância e monitoramento da leishmaniose tegumentar americana em Unidades Territoriais – Brasil, 1994-2001*. Boletim Eletrônico Epidemiológico, nº 5, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília, DF, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Guia de Vigilância Epidemiológica*, 7ª ed. Brasília, DF, Caderno 11, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*, Brasília, DF, p. 182 - 202, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Portal da Saúde*. 2012. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31927](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31927)>. Acesso: 17 de janeiro de 2015.

BRITO, M. E. F. et al. Identification of Potentially Diagnostic *Leishmania braziliensis* Antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot Analysis. *Clinical and vaccine immunology*, v. 7 p. 7 - 11, 2000.

BRYCESON, ADM. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia III. *Immunological studies. Trans. R Soc Trop Med Hyg*, v. 64, p. 380 - 387, 1970.

CABRERA, M. et al. Variations in the serum levels of soluble CD23, nitric oxide and IgE across the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, Venezuela, v. 88, p. 145 - 15, 2003.

CASTELLANO, L. E. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with Strong interferon-gamma production. *Human immunology*, v. 70, p. 383 - 90, 2009.

CASTÉS, M. et al. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol. Res*, v. 26, p. 233 - 238, 1993.

CHATTERJEE, M. et al. Distribution of IgG subclasses in antimonial responsive indian kala-azar patients. *Clin Exp Immunol*, v. 114, p. 408 - 413, 1998.

COFFMAN, RL. et al. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv. Immunol*, v. 54, p. 229 - 270, 1993.

CONVIT, J. et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 87, p. 444 - 448, 1993.

COUTINHO, S. G. et al. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, v. 31, p. 139 - 142, 1998.

D'ÁVILA, S. C. G. P. et al. Estudo retrospectivo dos casos de leishmaniose tegumentar americana diagnosticada no laboratório de patologia do Hospital de Base da FAMERP nos anos de 1995-2000, com enfoque clínico e anatomopatológico. *Arq. Ciênc. Saúde*, v. 11, p. 2 - 5, 2004.

DA - MATA, VL. et al. Detection of specific antibody isotypes and subtypes before and after treatment of american visceral leishmaniasis. *J Clin Lab Anal*, v. 14, p. 5 -12, 2000.

DINIZ, J. L. C. P. et al. O. Mucocutaneous leishmaniasis: clinical markers in presumptive diagnosis. *Braz J Otorhinolaryngol*, v. 77, p. 380 - 384, 2011.

DUARTE, M. L.; ROCHAEL, M. C. Perfil histopatológico e imuno-histoquímico da leishmaniose tegumentar americana com ênfase nos dendrócitos dérmicos FXIIIa+. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 81, p. 541 - 548, 2006.

EL AMIN, M. et al. Characterization of the humoral immune response in sudanese leishmaniasis: specific antibody detected by class and subclass-specific reagents. *Clin Exp Immunol*, v. 64, p. 14 - 19, 1986.

ELASSAD, A. M. S. et al. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. *Clin. Exp. Immunol*, v. 95 p. 294 - 299, 1994.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*, v. 8, p. 961-972, 2014.

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

FERREIRA, M. P. et al. Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of anti- *L. brasiliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, p. 215 - 217, 2006.

FINKELMAN, F. D. et al. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *Journal of immunology*, v. 140, p. 1022 - 7, 1988.

FOULET, F. et al. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome B gene. *Journal of clinical microbiology*, v. 45, p. 2110 - 5, 2007.

FRENCH, MAH.; HARRISON G. Serum IgG subclass concentrations in healthy adults: a study using monoclonal anti-sera. *Clin Exp Immunol*, v. 56, p. 473, 1984.

GASCAN, H. et al. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by IL-4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. *J Exp Med*, v. 173, p. 747 - 750, 1991.

GAZE, S. T. et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scandinavian journal of immunology*, v. 63, p. 70 - 78, 2006.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v. 36, p. 71-80, 2003.

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

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmanioses of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical microbiology reviews*, v. 6, p. 230 - 50, 1993.

GUTIERREZ, Y. et al. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am. J Trop. Med. Hyg*, v. 45, p. 281 - 289, 1991.

HAGAN P. IgE and protective Immunity to helminth infections. *Paras. Immunol*, v. 15, p. 14, 1993.

HAJJARAN, H. et al. Direct diagnosis of *Leishmania* species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. *Journal of clinical laboratory analysis*, v. 25, p. 20 - 4, 2011.

HEINZEL, F. P. et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct help T cell subsets. *The Journal of experimental medicine*, v. 169, p. 59 - 72, 1989.

ISHIZKA T. IgE and mechanisms of IgE-mediated hypersensitivity. *Ann Allergy*, v. 48, p. 313 - 19, 1982.

JUNQUEIRA PEDRAS, M. et al. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 47, p. 477 - 485, 2003.

LABRADA, M. et al. Evolution of immunoglobulin isotype specific to *Leishmania* in Tegumentary American Leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 84, p. 409 - 16, 1989.

LYNCH, NR. et al. Delayed-type hypersensitivity and Immunoglobulin E in american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*, v. 38, p. 877 - 881, 1982.

MACHADO, P. R. et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 105, p. 438 - 44, 2011.

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

MILES, S. A. et al. Role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*, v. 201, p. 747 - 754, 2005.

NASCIMENTO, M. D. S. B. et al. Estudo comparativo de anticorpos IgG e IgE *antileishmania* como marcadores de infecção e doença em indivíduos de área endêmica de leishmaniose visceral, em São Luis, MA. *Rev Soc. Bras. Med. Trop*, v. 39, p. 38 - 42, 2006.

NDAO, M. Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, v. 2009, p. 278 - 246, 2009.

NOGUEIRA, L. S. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo hospitalar de leishmaniose tegumentar americana (LTA): epidemiologia e tratamento. *An. bras. dermatol*, v. 76, p. 51 - 62, 2001.

NUNES, A. W. Avaliação das Respostas Imune Celular e Humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Dissertação de Mestrado*, Iptsp – UFG, 2001.

O'NEIL, C. E. et al. *Leishmania (Viannia) panamensi* -specific IgE and IgA antibodies in relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 49, p. 181 - 8, 1993.

OLIVEIRA, M. A. P. et al. *Leishmania spp* parasite isolation through inoculation on patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo*, v. 52, p. 83 - 88, 2010.

PASSOS, V. M. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brasil. *Acta tropical*, v. 72, p. 251 - 8, 1999.

PASSOS, V. M. et al. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. *Bull. World Health Org*, v. 78, p. 968 - 974, 2000.

PEDRAS, MJ. et al. Detecção de anticorpos séricos IgG e suas subclasse anti-*Leishmania braziliensis* e anti-*Leishmania amazonensis* antes e após o

tratamento de pacientes portadores de leishmaniose mucosa e mucocutânea. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 34, p.10 - 11, 2001.

PEREIRA, V. R. A. et al. Evaluation of anti-lived and anti-fixed *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment en localized cutaneous leishmaniasis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 74, p. 292 - 8, 2012.

PERLMANN, H. et al. IgE elevation and IgE anti-malarial antibodies in *Plasmodium falciparum* malaria: association of high IgE levels with cerebral malaria. *Clin. Exp. Immunol*, v. 97, p. 284 - 292, 1997.

REIS, L. D. 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, p. 439 - 43, 2008.

REY, L. *Bases da Parasitologia Médica*, 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2011.

RODRÍGUEZ, V. et al. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. *Parasite immunology*, v. 18, p. 341 - 5, 1996.

ROSS, R. Further notes on leishman's bodies. *British Medical Journal*, v. 2, p. 1401, 1903.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania Major* in mice. *Nature reviews. Immunology*, v. 2, p. 845 - 58, 2002.

SARAIVA, N. G. Epidemiologic, genetic and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. *American J. Trop. Med. Hyg*, v. 59, p. 86 - 94, 1998.

SCOTT, P.; FARRELL, J. P. Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. *Chemical immunology*, v. 70, p. 60 - 80, 1998.

SCOTT, P.; SCHARTON, T. Interaction between the innate and the acquired immune system following infection of different mouse strains with *Leishmania major*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 730, p. 84 - 92, 1994.

SHAHBAZI, F. et al. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. *Parasitology research*, v. 103, p. 1159 - 62, 2008.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. The in vitro cultivation of members of the *Leishmania braziliensis* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, p. 127, 1981.

SHAW, J. The leishmaniasis--survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 541 - 7, 2007.

SHIDDO, SA. et al. Visceral Leishmaniasis in Somalia. Significance of IgG subclasses and of IgE response. *Immunol Lett*, v. 50, p. 87 - 93, 1996.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 31, p. 423 - 431, 2009.

SINAN/SVS/MS. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*, v. 2, p. 1 - 24, 2010.

SINAN/SVS/MS. Leishmaniose Tegumentar Americana – Casos confirmados Notificados no Sistema de Informações de Agravos de Notificações – Sinan Net. Disponível em: <[www2.datasus.gov.br](http://www2.datasus.gov.br)>. Acesso em: jun. 2015.

SINGH, N. et al. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, v. 5, p. 485 - 97, 2012.

SOLANO - GALLEGO, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*, v. 39, p. 560 - 3, 2001.

SOONG, L. et al. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol*, v. 34, p. 735 - 51, 2012.

SOUSA - ATTA, M. L. B. et al. Immunoglobulin E antileishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 9, p. 101 - 4, 2002.

SOUZA, M. A. et al. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in american tegumentary leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, p. 137 - 141, 2005.

TAVARES, C. A. P. et al. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn*, v. 3, p. 657 - 67, 2003.

ULRICH, M. et al. Differing antibody IgG isotypes in the polar forms of leprosy and cutaneous leishmaniasis characterized by antigen-specific T cell anergy. *Clin Exp Immunol*, v. 100, p. 54 - 58, 1995.

VEGA-LOPÉS, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 16, p. 97 - 101, 2003.

VIDIGAL, C. D. P. et al. Enzyme immunoassay using *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigens for laboratorial diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Acta tropica*, v. 107, p. 208 - 12, 2008.

VOULDOUKIS, I. et al. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci*, v. 92, p. 7804 - 7808, 1995.

WALTON, BC. et al. Serodiagnosis of american leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. *Am J Trop Med Hyg*, v. 21, p. 296 - 99, 1972.

WALTON, B. C. et al. Observations on the in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. *The Journal of parasitology*, v. 63, p. 1118 - 9, 1977.

WHO. The world health report. *Changing history*, 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/whr/2004/en/index.html>>. Acesso em: junho, 2015.

WONG, S.Y. et al. Papel da imunoglobulina e específica para o diagnóstico da infecção aguda e toxoplasma toxoplasmoso. *J. Clin. Microbiol*, v. 31, p. 2952 - 2959, 1993.

# ANEXO 1

## Parecer do Comitê de Ética



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL  
HOSPITAL DAS CLÍNICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO ESPORTO  
Goiânia, 10/12/2004.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA,  
PROTOCOLADO NESTE COMITÊ SOB O Nº: 125/2004.**

Título: *Banco Imunobiológico das Leishmanioses da Região Centro Oeste (Leishbank) e subprojetos associados.*

Pesquisador (a) Responsável: *Miriam Cristina Leandro Dorta.*

Instituições onde será realizado o estudo: *Laboratório de Imunobiologia das leishmanioses do Departamento de micro, imuno, parasito e patologia do Instituto de Patologia Tropicas e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás/GO; Ambulatório de leishmaniose do Hospital Anuar Auad (HDT/Goiânia/GO) e Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás/GO.*

Apresentado ao CEPMHA/HC/UFG: *25/11/2004*

Relator: *Prof. Dr. Marcelo Medeiros.*

**DOCUMENTOS RECEBIDOS:**

O presente protocolo se enquadra no Grupo III. O Pesquisador responsável *não* necessita aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, sendo necessário apenas o envio de relatórios trimestrais.

**COMENTÁRIOS:**

- a) Objetivo Geral do Projeto: *Criar um banco de leishmanias isoladas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana ou Visceral e estocar*

1ª Avenida, s/nº, Setor Leste Universitário - Goiânia - Goiás  
CEP: 74 605 - 050 - Fone: (0xx62) 261 30 06 - Fax : (0xx62) 261 29 91

*materiais biológicos dos pacientes com suspeita da doença, incluindo biópsias, sangue total, soro e células purificadas. Todo o material armazenado no banco será utilizado exclusivamente para pesquisas de caracterização dos parasitos, interações parasitos-células hospedeiras e avaliação das imunidades inata, humoral e celular dos hospedeiros. Estes estudos visam a identificação de antígenos candidatos a melhorar a eficiência de vacinas, além de melhorias no diagnóstico e acompanhamento da doença.*

- b) Objetivos Específicos do Projeto: a) Isolar e caracterizar molecularmente as espécies/isolados de Leishmanias da Região Centro Oeste; b) Avaliar o comportamento de diferentes espécies/isolados de Leishmania prevalentes na região Centro-Oeste com relação às respostas das células do sistema imune e a evolução clínica da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e da Visceral; c) Identificar moléculas alvo para imunização experimental de animais de laboratório contra LTA, incluindo a imunização genética; d) Avaliar antígenos preparados com as espécies/isolados de Leishmanias em testes in vivo em animais de laboratório (Reação Intradérmica de Montenegro) e in vitro (células humanas e murinas), comparando com antígeno padrão nacional e com antígenos preparados com cepas de referência da OMS; e) Estudar os aspectos clínicos, imunológicos, epidemiológicos, de diagnóstico e de tratamento dos pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana ou Visceral, provenientes da região Centro-Oeste, incluindo a leishmaniose em assentamentos de trabalhadores rurais do Movimento Sem Terra no Estado de Goiás.*

*Sangue de indivíduos não infectados com leishmania será obtido no Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da UFG. O soro e as células destes indivíduos serão estocadas sem a identificação do doador. O Termo de Consentimento utilizado será o mesmo do Banco de Sangue, no qual o doador doa até 500ml de sangue.*

Sumario do projeto:



Descrição e caracterização da amostra (população alvo): Serão incluídos no estudo todos os pacientes recebidos no Hospital Anuar Auad (HDT), situado em Goiânia (GO), com suspeita de LTA ou LV, com faixa etária entre 07 e 65 anos, no período de maio de 2004 a junho de 2014. Também serão incluídos todos os pacientes, identificados através de triagem, pelos médicos do HDT em acampamento do MST em Goiás. Após o diagnóstico clínico e epidemiológico, serão colhidos raspados da lesão, biópsias das lesões (5mm) e sangue endovenoso (5ml). O material é fundamental para um diagnóstico mais preciso da doença no paciente e posterior tratamento.

Critério de Inclusão e Exclusão: Somente serão incluídos como sujeitos do estudo (1) aqueles pacientes que tiverem resultado positivo para o parasito e concorde em participar da pesquisa. Nestes serão colhidos 10 ml de sangue ao invés dos 5ml utilizados no diagnóstico, exceto quando não for recomendada a retirada deste sangue adicional. Os blocos de parafina serão armazenados no Leishbank do Laboratório de Imnobiologia das Leishmanioses. Os parasitos dos que concordarem e não concordarem serão estocados no banco. Mas nenhum material biológico dos que não concordarem serão estocados.

Adequação da Metodologia: O projeto propõe uma pesquisa de abordagem experimental, englobando etapas específicas desde o diagnóstico clínico, laboratorial parasitológico e isolamento de parasitos; avaliação do comportamento das diferentes espécies/isolados de Leishmania "in vitro" e "in vivo", avaliação da imunidade inada e da imunidade celular; resposta humoral; e caracterização dos genes de L. (V.) brasiliensis que codificam as proteínas similares aos antígenos LACK, TSA, LMST11 e LEIF de L. (L.) major; amplificação e purificação dos genes das espécies de L. (V.) brasiliensis.

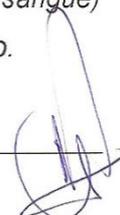
Adequação das condições: Não informado.

EM ACORDO COM A RESOLUÇÃO 196/96, O PRESENTE PROTOCOLO ESTÁ:

- a) Quanto ao preenchimento da folha de rosto: *Estudo a ser realizado – em parte – no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG), mais especificamente no Banco de Sangue. Outra etapa da pesquisa será realizada no Hospital Anuar Hadad (HDT) em Goiânia.*
- b) Quanto à estrutura do Protocolo: *O protocolo apresenta aspectos descritivos da pesquisa com as respectivas informações aos sujeitos e os pesquisadores têm qualificação condizente à proposta de estudo a qual tem apoio financeiro do CNPq.*
- c) Quanto à justificativa de uso de placebo: *Não se aplica.*
- d) Quanto à justificativa de suspensão terapêutica (wash-out): *Não se aplica.*
- e) Quanto aos riscos e benefícios: *A responsável apresenta apenas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que a “avaliação do risco da pesquisa é mínimo”.*
- f) Quanto ao retorno de benefícios para o sujeito e ou para a comunidade: *Não foram apresentados, mas entendo que está implícito em uma frase do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: “Os resultados obtidos poderão acrescentar informações importantes no conhecimento da doença, que poderá beneficiar no futuro todas as pessoas que estão expostas à Leishmaniose.*

QUANTO A ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E FORMA DE OBTÊ-LO:

- a) Linguagem: *Objetiva, trazendo informações suficientes para que o sujeito possa decidir sobre sua participação ou não na pesquisa.*
- b) Justificativa, objetivos e procedimentos: *Foram apresentados devidamente.*
- c) Desconfortos e riscos: *Os procedimentos invasivos (biópsia e coleta de sangue) são devidamente especificados e justificada a sua importância no processo.*
- e) Métodos alternativos existentes: *Não foram apresentados*



## ANEXO 2

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA/UFG  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA, PARASITOLOGIA E  
PATOLOGIA**

Rua Delenda Rezende de Melo – S/N – Setor Universitário – 74605-050 – Goiânia – Goiás  
Tel. (062) 261-6497 – Ramal 218 – Fax: 202 – 3066

**HOSPITAL ANUAR AUAD (HDT)/SES**  
Av. Contorno S/N – Jardim Bela Vista – 74853-400 – Goiânia – Goiás

#### TERMO DE CONSENTIMENTO

**Projeto: “Epidemiologia Molecular de Leishmaniose tegumentar Americana (LTA) e Avaliação da Resposta Imunológica de Pacientes com Leishmaniose na Região Centro Oeste.”**

Pelo presente termo de consentimento, manifesto voluntariamente minha concordância em participar do estudo acima intitulado. Foram-me informados todos os procedimentos relacionados à minha participação neste estudo, os quais consistem em realização de exame clínico, coleta de amostras no local da lesão de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), através de biópsia e aspiração subcutânea no bordo da lesão, aplicação do teste de intradermorreação de Montenegro para diagnóstico imunológico da LTA, coleta de sangue para avaliação da resposta imunológica contra o parasito.

Os exames serão realizados antes do início do tratamento e após 3, 6, 12 e 18 meses.

As implicações relacionadas à minha participação neste estudo foram bem esclarecidas pela equipe responsável.

Tive oportunidade e fui incentivado a pedir qualquer esclarecimento adicional pela que julgasse necessário, sobre qualquer questão relacionada à minha participação no estudo, e cada uma destas questões foi esclarecida pela equipe.

Estou certo que os resultados e conclusões obtidas pelo desenvolvimento deste estudo, poderão contribuir para o melhor conhecimento da LTA e, conseqüentemente, para suportar a adoção de novas medidas para o seu efetivo controle.

Minha privacidade será garantida quando das publicações científicas oriundas deste estudo.

Nome do paciente

..... de ..... 2000

Local e data

**Responsáveis pela pesquisa: Dra. Miriam C. Leandro Dorta  
Ms. Ledice Inácia**