



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

DOUGLAS OLIVEIRA ANDRADE

**Análise da variação de IgG3 e IgG total específicas para antígenos
de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em soro de pacientes com
leishmaniose cutânea antes e após o tratamento.**

**Goiânia
2015**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
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 assinaladas 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:

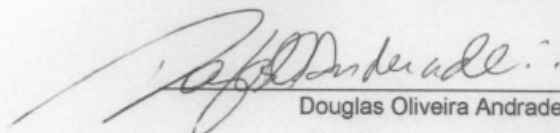
Nome completo do autor: Douglas Oliveira Andrade

Título do trabalho: **Análise da variação de IgG3 e IgG total específicas para antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em soro de pacientes com leishmaniose cutânea antes e após o tratamento.**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

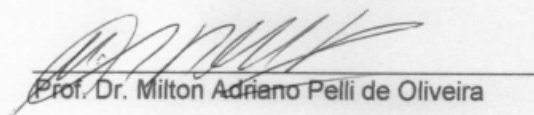
Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Douglas Oliveira Andrade

Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 21/11/18

¹ 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.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

DOUGLAS OLIVEIRA ANDRADE

**Análise da variação de IgG3 e IgG total específicas para antígenos
de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em soro de pacientes com
leishmaniose cutânea antes e após o tratamento.**

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.

Orientador: Prof. Dr. Milton Adriano
Pelli de Oliveira

**Goiânia
2015**

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

Andrade, Douglas Oliveira

Análise da variação de IgG3 e IgG total específicas para antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em soro de pacientes com leishmaniose cutânea antes e após o tratamento. [manuscrito] / Douglas Oliveira Andrade. - 2015.
xi, 42 f.

Orientador: Prof. Dr. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira.

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

Bibliografia. Anexos.

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

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Imunoglobulina G. 3. Leishmaniose .
I. Oliveira, Dr. Milton Adriano Pelli de , orient. II. Título.

CDU 612.017



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE DOUGLAS OLIVEIRA ANDRADE - Aos dezoito dias do mês de setembro do ano de 2015 (18/09/2015), às 9:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA, LEDICE INÁCIA DE ARAÚJO PEREIRA e RUY DE SOUZA LINO JÚNIOR, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: “ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE IgG3 E IgG TOTAL ESPECÍFICAS PARA ANTÍGENOS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* EM SORO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA ANTES E APÓS O TRATAMENTO”, em nível de MESTRADO, área de concentração em IMUNOLOGIA, de autoria de DOUGLAS OLIVEIRA ANDRADE, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA - MESTRADO INTERINSTITUCIONAL - MINTER UFG/UNIRG, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA, 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 argüiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de argüição, 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

Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira
Profa. Dra. Ledice Inácia de Araújo Pereira
Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior

Aprovado / Reprovado

APROVADO
APROVADO
APROVADO

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato HABILITADO, (**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 **IMUNOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 10 h 40 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:

Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira (IPTSP/UFG)
Profa. Dra. Ledice Inácia de Araújo Pereira (IPTSP/UFG)
Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior (IPTSP/UFG)
Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura
[Assinatura]
[Assinatura]
[Assinatura]
[Assinatura]

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

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Douglas Oliveira Andrade

Orientador (a): Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Membros:

1. Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

2. Prof^a. Dr^a. Ledice Inácia de Araujo Pereira

3. Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior

Data:18/09/2015

AGRADECIMENTOS (se desejado)

Primeiramente a Deus por ter me abençoado com grandes oportunidades de evolução pessoal e profissional, sendo o mestrado, uma delas. Agradeço aos colegas professores da UNIRG por apoiarem o MINTER

Aos amigos, professores e ex-coordenadores do curso de odontologia pelo apoio e por se esforçarem para conciliar meus horários de aulas com as viagens.

Às colegas de MINTER pela ajuda em todos os módulos. Aos colegas de laboratório, Natalia, Poliana, Clayson, José Victor, João e principalmente à Lucilla pela paciência de me ensinar tantas coisas básicas de um laboratório que para um cirurgião dentista eram coisas de outro mundo.

Ao meu orientador, professor Milton, pela orientação neste trabalho de tão grande importância para minha carreira científica e pela paciência, dedicação, confiança depositada em mim e por pensar sempre em maneiras de minimizar o problema da distância até Goiania.

Ao Seu Célio, Dona Naides, Dona Terezinha, Rayanne, Welber, Nilza, Adriana, Ranieri e os meninos por me adotarem como membro da família. A coordenadora do curso de Odontologia e minha grande amiga, Zeila por ser essa pessoa iluminada que me ensina tanto, além de ser uma companheira de projetos, admiradora e grande incentivadora de meus trabalhos.

À minha família, meus pais Fausto e Nildes, meus irmãos Fausto e Adriana e minha cunhada Daniela, que mesmo longe, tenho certeza que todos se sentem realizados com as minhas conquistas e serão eternos torcedores de minha evolução profissional e pessoal .

À minha amada companheira, amiga, confidente, conselheira, amante e esposa Danyelle por sempre ter me encorajado desde quando iniciei o pré-projeto em nossa Lua de Mel até quando o cansaço parecia que iria me

fazer desistir, a sua torcida e seus conselhos sempre serviram de combustível para as minhas vitórias.

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	x
SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Leishmanioses.....	01
1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana.....	02
1.3 Características Clínicas.....	03
1.4 Resposta Imunológica.....	04
1.5 Diagnóstico.....	05
1.6 Tratamento.....	07
1.7 Avaliação de soros através da Citometria de Fluxo.....	07
1.8 Avaliação de soros através do ELISA.....	08
1.9 Avaliação de soros através do Western Blotting.....	09
2 JUSTIFICATIVA	12
3 OBJETIVO.....	13
3.1 Objetivo geral.....	13

3.2	Objetivos específicos.....	13
4	MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1	Pacientes e obtenção dos soros	14
4.2	Obtenção de antígenos das formas promastigotas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> e obtenção de extrato protéico total.....	15
4.3	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	15
4.4	Eletroforese em SDS-PAGE	16
4.5	Western blotting	17
4.6	Análises estatísticas.....	17
5	RESULTADOS.....	18
6	DISCUSSÃO.....	32
7	CONCLUSÕES	35
8	REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	41

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

FIGURAS E TABELAS

- Figura 1. Taxa de leishmaniose tegumentar e porcentagem de forma mucosa no estado de Goiás de 2010 a 2013.....01
- Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.....02
- Figura 3. Leishmaniose mucocutânea com extensa destruição do lábio superior causada por *L. braziliensis*.....04
- Figura 4. Lesão em membro inferior causado por *L. braziliensis*.....04
- Figura 5. **Marcador de peso molecular SeeBlue® Plus2 (NOVEX)**.....16
- Tabela 1. **Características clínicas dos pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana** Análise das características dos 15 pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD) e Leishmaniose Mucosa (LM), participantes do estudo18
- Figura 6. **IgG3 específica para leishmânia em soros de pacientes retorna aos valores normais mais rapidamente que IgG total.** Soros de pacientes diagnosticados com LTA antes do tratamento (T0) e após o tratamento (6 e 12/18 meses) foram testados quanto à reatividade em ELISA para antígenos de *L. (V.) braziliensis*. As barras indicam média (\pm DP) das absorbâncias. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos medida pelo teste de ANOVA seguido por Tukey ($p < 0.05$).....19
- Tabela 2. **Características clínicas dos pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana separados em grupos conforme o período de cura clínica.** Os pacientes participantes foram divididos em dois grupos tendo como referência o tempo de cura. O grupo A* composto por pacientes que apresentaram

cura clínica em 1 mês e grupo B** pacientes que apresentaram cura clínica entre 3 e 18 meses.....20

Figura 7.: Baixa quantidade de IgG3 no momento do diagnóstico está associada a cura mais rápida da lesão. Soros de pacientes diagnosticados com LTA antes do tratamento (T0) e após o tratamento (6 e 12/18 meses) em dois grupos; A (cura em 1 mês) e B (cura após 1 mês), foram testados quanto à reatividade em ELISA para antígenos de *L. (V.) braziliensis*. As barras indicam média (\pm DP) das absorbâncias. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos medida pelo teste de ANOVA seguido por Tukey ($p < 0.05$).....21

Figura 8. Reatividade das imunoglobulinas (IgG3 e IgG total) com antígenos de *L. (V.) braziliensis* no Western Blotting para controles negativos. Cada fita representa a reatividade de IgG3 ou IgG total contra antígenos totais de *L. (V.) braziliensis*. A primeira e a última fita correspondem ao padrão de peso molecular. No quadro abaixo encontra se a associação com a absorbância detectada no ELISA.....22

Figura 9. Densidade Ótica no ELISA e a reatividade das imunoglobulinas (IgG3 e IgG total) com antígenos de *L. (V.) braziliensis* no Western Blotting foi menor nos pacientes com cura precoce.O gráfico de barras (esquerda) representa média (\pm DP) das absorbâncias observada no soro de cada paciente ou controle e a figura (direita) representa a reatividade em Western Blotting para antígenos de *L. (V.) braziliensis* pelo soro do mesmo paciente. A seta grossa indica reatividade a antígenos de com peso molecular próximo de 28 kDa e a seta fina representa reatividade a antígenos de antígenos de 49kDa.....30

ANEXOS

Anexo 1 Parecer do Comitê de Ética40
Anexo 2 Termo de consentimento Livre Esclarecido.....41

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

CT – Controle

DO – Densidade Ótica

DP – Desvio padrão

ELISA – Ensaio imunoenzimático

FC-AFPA-IgG – Citometria de fluxo de anticorpos IgG anti promastigotas fixadas

FC-ALPA-IgG – Citometria de fluxo de anticorpos IgG anti promastigotas vivas

HDT – Hospital de Doenças Tropicais

IDRM – Imunodermo reação de Montenegro

IgG – Imunoglobulina G

kDa – Kilo Daltons (1000 Daltons)

LC – Leishmaniose cutânea

LCL – Leishmaniose cutânea localizada

LD – Leishmaniose cutânea disseminada

LM – Leishmaniose mucosa

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose visceral

PCR – Reação da polimerase em cadeia

SBF – Soro bovino fetal

RESUMO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças endêmicas em 98 países, com uma incidência estimada de até 1,6 milhões de casos por ano (0,7-1,2 milhão de leishmaniose tegumentar e 0,2 a 0,4 milhão de leishmaniose visceral). O critério de cura da leishmaniose tegumentar americana adotado hoje é a cura completa da lesão. Anticorpos anti-*Leishmania* da subclasse IgG3 decaem mais rapidamente que os anticorpos IgG totais em pacientes curados. O presente trabalho tem objetivo de identificar diferenças no reconhecimento de proteínas de *L. (V.) braziliensis* por anticorpos IgG totais ou IgG3 obtidos de soro de pacientes com leishmaniose tegumentar americana antes e após o tratamento. Soros de 15 pacientes infectados com *L. braziliensis* atendidos no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad foram testados por ELISA contra extratos brutos de *L. braziliensis*. Quando analisados todos os pacientes, foi possível observar que as absorvâncias no ELISA para a subclasse IgG3 anti-*Leishmania* ficou semelhante aos controles com 6 meses, o que só aconteceu para anticorpos totais com 12/18 meses. Com a separação dos pacientes em A: pacientes com cura clínica antes de um mês e grupo B: pacientes com cura clínica após um mês, observou-se que as absorvâncias no ELISA para IgG3 no grupo A era semelhante à dos controles no momento do diagnóstico. Identificamos, pelo *Western Blotting*, que a reatividade à proteína de 49 kDa pela IgG3 de pacientes era presente principalmente no grupo B. A proteína de 28 kDa reagiu com IgG3 de pacientes do grupo B antes da cura clínica e a proteína de 14 kDa reagiu com IgG3 de três soros controles. Nossos dados sugerem que a proteína de 49 kDa pode ser usada em ELISA para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes portadores de LTA e que a proteína de 14kDa pode ser responsável por reações falso positivas.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of endemic diseases in 98 countries, with an estimated incidence up to 1.6 million cases per year (0.7-1.2 million of cutaneous leishmaniasis and 0.2 to 0.4 million visceral leishmaniasis). The criteria for the cure of american tegumentary leishmaniasis adopted nowadays is the complete healing of the lesion. IgG3 subclass anti-leishmania antibodies decrease faster than the total IgG antibodies in cured patients. This study was aimed to identify differences in the recognition pattern of *L. (V.) braziliensis* protein by total IgG or IgG3 antibodies obtained from cutaneous leishmaniasis infected patients' serum before and after treatment. Sera of 15 patients infected with *L. braziliensis* attended at the Tropical Diseases Hospital Anuar Auadi were tested by ELISA against crude extracts of *L. braziliensis*. When all patients were analyzed, it was observed that anti-leishmania IgG3 absorbance levels measured by ELISA were similar to the controls levels at 6 month. The absorbance levels of total antibodies in control and infected patients reached similarity only at 12/18 months. After split patients into group A: healing of the lesion before one month and B: healing of the lesion after one month, it was observed that absorbance levels in ELISA for IgG3 in group A was similar to the controls levels at the time of diagnosis. It was also observed, by Western Blotting, that the IgG3 reactivity of IgG3 to 49 kDa protein was present mainly for group B patients. The 28 kDa protein showed IgG3 reactivity mainly in group B the healing os lesions and the 14 kDa protein showed IgG3 reactivity in some controls our data suggest that the use of 49 kDa protein in ELISA may be useful for diagnosis and following up of patients and the 14kDa protein may be important in false-positive results.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses constituem um grupo de doenças endêmicas em 98 países, com uma incidência estimada de até 1,5 milhão de casos por ano (0,7 a 1,2 milhão de leishmaniose tegumentar e 0,2 a 0,4 milhão de leishmaniose visceral (LV). Estima-se que 400 milhões de pessoas vivem em situação de risco para a doença em todo mundo, sendo o Brasil um dos 10 países que apresentam maior estimativa de ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar e o de maior incidência da América do Sul (ALVAR *et al.*2012)

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma das nove principais doenças tropicais. No Brasil, a leishmaniose tegumentar é uma doença endêmica com mais de 27.000 novos casos anuais e uma incidência média de 17,3 casos por 100.000 habitantes. (ALVAR *et al.*2012) No estado de Goiás, a incidência por 100.000 habitantes em 2013 foi 5,56 (Figura 1) e desses, 12,01% forma da forma mucosa.



Figura 1. Taxa de leishmaniose tegumentar e porcentagem de forma mucosa no estado de Goiás de 2010 a 2013 (adaptado <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/723-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11328-situacao-epidemiologica-dados>)

1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

Denomina-se leishmaniose tegumentar americana (LTA) o conjunto de enfermidades causadas por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem *Kinetoplastida*, da família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania*, que acometem a pele e/ou mucosas do homem e de diferentes espécies de animais silvestres e domésticos das regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo. Nas Américas, são transmitidas entre os animais e o homem pela picada das fêmeas de diversas espécies de flebotomíneos (*Diptera, Psychodidae, Phlebotominae*) do gênero *Lutzomyia*, não havendo transmissão natural de pessoa a pessoa. O período de incubação da doença no ser humano é, em média, de dois a três meses, podendo variar de duas semanas a dois anos (BRASIL, 2006).

A leishmânia é um protozoário dimórfico que existe como forma promastigota flagelado no inseto vetor e como amastigota intracelular no hospedeiro mamífero. A diferenciação celular da forma promastigota em amastigota ocorre dentro dos macrófagos do hospedeiro, onde também se multiplicam, provocando as lesões (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987). A infecção caracteriza-se pelo parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear da derme e das mucosas do hospedeiro vertebrado (monócitos, histiócitos e macrófagos), pelo protozoário na forma amastigota (Ministério da Saúde, 2006) (figura 2).

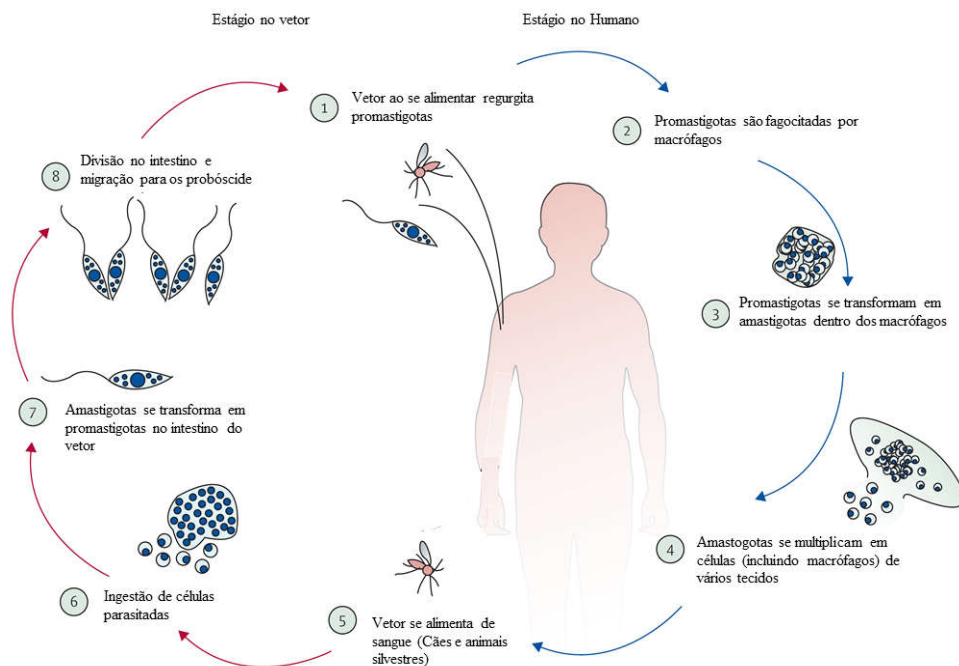


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Adaptado de REITHINGER et al. 2007)

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas, somente em animais. No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2007). No Brasil, cerca de 90% dos casos de LTA (cutânea e mucocutânea) são causadas por *L. (V.) braziliensis* sendo esta espécie mais relacionada com lesões graves e está frequentemente associada à invasão de mucosas. (ROUGERON *et al*, 2009).

1.3 Características Clínicas

Classicamente, a LTA pode ser dividida em pelo menos quatro formas: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose cutânea disseminada e leishmaniose mucosa ou mucocutânea. A forma mucosa ou mucocutânea, que se desenvolve em cerca de 2% a 10% das pessoas infectadas com *L. (V.) braziliensis*, é considerada a forma mais preocupante, uma vez que a boca, nariz, faringe e laringe são afetadas por uma reação inflamatória que pode levar à perfuração do septo nasal e destruição dos tecidos causando desfigurações do indivíduo (figura 3), não ocorrendo cura espontânea (PEDRAS *et al.*2003; REITHINGER *et al.* 2007). Na forma cutânea localizada, as lesões são geralmente ulceradas e apresentam poucos parasitos, com boa resposta ao tratamento e com tendência para a cura espontânea, a leishmaniose cutânea difusa caracteriza-se por lesões nodulares, infiltrativas e alta resistência à quimioterapia e evolui com recaídas frequentes; e a leishmaniose cutânea disseminada é caracterizada por várias lesões papulares e acneiformes, com parasitos raros quando comparado com a forma difusa, com frequente o envolvimento das mucosas (REIS 2006; BRASIL 2009).

A LTA, geralmente, afeta partes descobertas do corpo que são facilmente encontradas pelos flebotomíneos, incluindo o rosto, pescoço e braços. Após um período de incubação médio de duas semanas a três meses, uma pápula vermelha aparece, evoluindo para uma placa ou nódulo. Geralmente ocorre a evolução para úlcera, que é bem circunscrita com uma borda violácea, com base granulomatosa e com crosta, suas margens são hipertróficas, mas sem um extensivo escavamento (figura 4). Nódulos

subcutâneos indolores ou cordões borrachóides podem se desenvolver ao redor da úlcera por causa da propagação linfática regional. Os linfonodos de drenagem podem estar aumentados e revelar parasitas em amostras de biópsia. Após aproximadamente 6 a 12 meses, a úlcera pode regridir espontaneamente, deixando uma cicatriz com hipopigmentação ou hiperpigmentação (GREVELINK *et al*,1996; BRASIL, 2007; REITHINGER *et al*,2007)

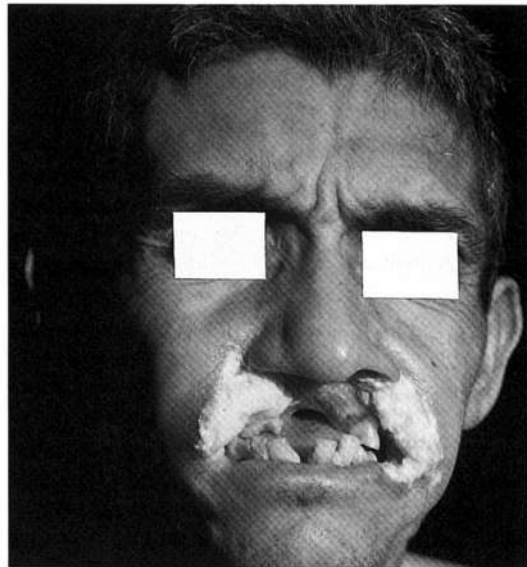


Figura 3. Leishmaniose mucocutânea com extensa destruição do lábio superior causada por *L. braziliensis* (GREVELINK *et al.*, 1996).



Figura 4. Lesão em membro inferior causado por *L. braziliensis* (GREVELINK *et al.*, 1996).

1.4 Resposta Imunológica

Nos humanos a resposta imune à infecção por *Leishmania*, ainda não está bem caracterizada em virtude de sua complexidade. A resposta imune adquirida é dependente de células T e a expansão de células Th1 e Th2 está relacionada a resistência e a susceptibilidade à infecção respectivamente. Com a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ do perfil Th1 específicas para *Leishmania* ocorre a ativação de macrófagos para destruírem parasitos intracelulares e isso leva a resistência à infecção. A produção de IL-4 pelas células Th2 tem ação supressora sobre macrófagos resultando em aumento da sobrevivência do parasito e exacerbação das lesões.(Abbas e Litchman 2012) Além disso a resposta imune que ocorre na leishmaniose também envolve a saliva do flebótomo e moléculas co-estimuladoras (REIS *et al.*,2006).

Existem diferenças no perfil de resposta imune dependendo da manifestação clínica da LTA, sendo que, nas formas cutâneas e mucocutâneas, existe um perfil de resposta do tipo Th1, com forte imunidade mediada por células e a predominância de isotipos IgG1, IgG2 e IgG3. A leishmaniose cutânea difusa está associada à resposta imune de perfil Th2 com predominância do isotipo IgG4 (SOUZA 2005). Pacientes normalmente apresentam altos níveis de IgE com um maior tempo de evolução da doença. Pacientes com a forma mucocutânea apresenta os níveis de IgA aumentados (O'NEIL *et al.*, 1993). Segundo Abbas e Lichtman (2009) uma das principais funções efetoras da IgG1 e IgG3 é a opsonização, caracterizada com a facilitação de fagocitose, em que anticorpos ligam-se aos antígenos e suas porções Fc são reconhecidas pelos receptores para Fc localizados na superfície de fagócitos. Esse complexo antígeno-anticorpo é endocitado, porém, ao contrário do que acontece com a maioria dos protozoários que são destruídos após serem fagocitados, a *Leishmania* é capaz de sobreviver dentro do vacúolo fagocítico.

A intensidade da resposta humoral parece estar relacionada tanto com a carga parasitária, quanto com a cronicidade da infecção, sendo observados altos títulos de anticorpos em todas as manifestações clínicas da LTA. (REIS *et al.*,2006)

1.5 Diagnóstico

Na ocorrência de lesões típicas de leishmaniose, o diagnóstico clínico e epidemiológico pode ser realizado, especialmente se o paciente procede de áreas endêmicas ou esteve presente em lugares onde há casos de leishmaniose. O diagnóstico é complementado por testes parasitológicos e imunológicos. (BRASIL, 2007).

O diagnóstico diferencial engloba uma séria de outras doenças, dentre elas a sífilis, hanseníase, tuberculose, micobacterioses atípicas, paracoccidioidomicose, histoplasmoze, lobomicose, esporotricose, cromoblastomicose, piodermites, rinoscleroma, granuloma facial de linha média, sarcoidose, lúpus eritematoso discóide, psoríase, infiltrado linfocítico de Jessner, vasculites, úlceras de estase venosa, úlceras decorrentes da anemia falciforme, picadas de insetos, granuloma por corpo estranho, ceratoacantoma, carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular, histiocitoma, linfoma cutâneo e outros tumores. (BRASIL 2009)

Os métodos parasitológicos, incluindo a detecção de parasitas em esfregaços, análise histopatológica e cultura *in vitro* são as melhores maneiras para confirmar o diagnóstico da leishmaniose. No entanto, devido à escassez de parasitas nas lesões da pele e mucosas, os testes parasitológicos podem apresentar sensibilidades variadas. Portanto, o diagnóstico de rotina é realizado principalmente combinando as características clínicas / epidemiológico com métodos imunológicos. As abordagens sorológicas, tais como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) representam importantes ferramentas de diagnóstico, porém a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) é o teste imunológico mais utilizado (PASSOS *et al.*, 2000). A IDRM pode dar resultados positivos após anos de cura clínica e também em pacientes que tiveram apenas infecções, o que invalida seu uso no diagnóstico de lesões recidivantes em indivíduos que já tiveram a doença (VIDIGAL *et al* 2008).

O uso da maioria dos métodos sorológicos disponíveis para o diagnóstico de LTA ainda é controverso, principalmente considerando a baixa sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Os principais fatores responsáveis pelo baixo desempenho das técnicas convencionais sorológicas compreendem os títulos de anticorpos baixos observados em pacientes com LTA (BRITO *et al.*, 2000), a falta de correlação entre a sorologia positiva e a presença de doença ativa (BRITO *et al.*, 2001; GONTIJO *et al*, 2002) e a elevada frequência de reatividade cruzada com os outros Tripanosomatídeos, principalmente *L. chagasi* e *Trypanosoma cruzi* (VEXENAT *et al*, 1996).

Assim, o desenvolvimento de novas metodologias mais eficazes para o diagnóstico representa um campo relevante de investigação. Vários esforços têm sido feitos com o objetivo de construir uma abordagem mais confiável para o diagnóstico sorológico da LTA usando preparações de antígenos distintos para detectar anticorpos

anti-leishmânia (GONÇALVES *et al.*, 2002; RYAN *et al.*, 2002; CELESTE *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2006). Um método confiável para o diagnóstico, baseado em citometria de fluxo para detectar anticorpos anti-*L. (V.) braziliensis*, foi descrito por Rocha *et al.* (2002). Embora estes autores demonstrassem a aplicabilidade do teste para o diagnóstico de LTA, a metodologia proposta apresentava alguns inconvenientes práticos, principalmente, devido ao uso de parasitas vivos, bem como as dificuldades para manter culturas constantes de *L. (V.) braziliensis* para fornecer parasitas vivos para diagnóstico de rotina, e a necessidade do citômetro de fluxo que é caro e ausente em vários laboratórios. Apesar destes inconvenientes, o elevado desempenho da sorologia pela citometria de fluxo, em comparação com metodologias convencionais aplicados no diagnóstico da LTA, estimulam os avanços para a otimização desta metodologia, utilizando antígenos de *L. (L.) amazonensis* fixados como suporte para detecção de IgG e sus subclasses (ROCHA *et al.* 2006).

1.6 Tratamento

O tratamento da LTA é baseado na quimioterapia, principalmente com a administração de antimônio pentavalente. Os antimoniais são altamente tóxicos e são administrados através de injeções endovenosas ou intramusculares, por um período de 20 a 30 dias. Em caso de falhas terapêuticas, deve-se optar por medicamentos de segunda escolha. (BRASIL 2009).

Além da toxicidade, uma das limitações no tratamento é a falta de um critério objetivo para a cura, sendo que o critério adotado por muitos clínicos é a cura completa da lesão que consiste para a forma cutânea, da epitelização das lesões ulceradas, regressão total da infiltração e do eritema. Para a forma mucosa a cura é baseada na regressão de todos os sinais e comprovado pelo exame otorrinolaringológico. (BRASIL 2009) No entanto, este é um critério insatisfatório, já que a reativação de lesões podem ocorrer mesmo após o tratamento (GONTIJO *et al.* 2003), por isso é necessário que o paciente faça acompanhamento por um período de 12 meses após o tratamento para ser avaliada a cura clínica (BRASIL 2009). A Organização Mundial de Saúde sugere que os critérios clínicos sejam suportados por dados sorológicos, portanto, esses fatos apontam para a necessidade de novas ferramentas que possam ajudar a determinar o diagnóstico e o prognóstico eficiente da leishmaniose tegumentar americana. (BRASIL, 2006)

1.7 Avaliação de soros através da Citometria de Fluxo

Pissinate *et al.* (2008) analisaram por citometria de fluxo a detecção de anticorpos (IgG) anti-promastigotas de *L. amazonensis* fixados com paraformaldeído (FC-AFPA-IgG) e concluíram que o uso da FC-AFPA-IgG apresentou um excelente desempenho para diagnosticar a LTA, além de demonstrar um potencial no diagnóstico diferencial com outras doenças dermatológicas.

Gomes *et al.* (2010) analisaram por citometria de fluxo a porcentagem de parasitas com fluorescência positiva, após a incubação de promastigotas de *L. chagasi* prefixadas com paraformaldeído, em amostras de soros de pacientes com LV. Antes do tratamento, o perfil das subclasses de IgG foi caracterizado pela presença de IgG1 maior do que IgG3 e ausência de IgG2 e IgG4 nos soros testados. A análise de amostras individualmente para FC-AFPA-IgG1 indicou que 19% dos pacientes apresentavam soros não reagentes aos dois meses pós-tratamento. Aos seis meses, o número de não reagentes aumentou para 76% dos pacientes. Já para FC-AFPA-IgG3, 90,5% dos pacientes apresentaram soros não reagentes aos dois meses e 95,2% dos pacientes aos seis meses, mostrando que a IgG3 pode ser um biomarcador para monitorar a cura pós-terapêutica.

Pereira *et al.* (2012) mostraram que a citometria de fluxo tanto para anticorpos anti-leishmânia vivas (FC-ALPA), quanto anti-leishmânia fixadas, têm potencial promissor para identificar casos ativos de LTA, já que a porcentagem de parasitas fluorescentes positivos para FC-ALPA-IgG e FC-AFPA-IgG antes do tratamento foi 86% e 90% respectivamente, porém, os autores sugerem que novos estudos são necessários para se obter valores clínicos dessa abordagem, podendo assim validar seu uso em futuras pesquisas.

Para verificar um padrão sorológico de doença e de cura, Garcia *et al.* (2009) compararam testes sorológicos de paciente portadores de LV com pacientes tratados. Eles concluíram que existe um melhor potencial do uso da FC-AFPA-IgG (total) diagnosticar a LV e avaliar a cura pós-terapêutica em comparação ao ELISA. O uso deste último método não prevê falhas pós-terapêuticas e recidivas.

1.8 Avaliação de soros através do ELISA

Em pacientes portadores de LTA, pode ser observada uma predominância de IgG1, seguida de IgG3 e níveis semelhantes e mais baixos de IgG2 e IgG4, caracterizando dessa forma, a IgG1 e IgG3 como as subclasses de IgG mais promissoras para o diagnóstico de LTA. (SOUZA *et al.*, 2005; PISSINATE *et al.* 2008). Souza *et al.*

(2005) analisaram os perfis das classes de imunoglobulinas pelo teste ELISA, utilizando antígeno solúvel de *L. amazonensis* e observaram que nas amostras avaliadas, além da IgG e IgE, que estavam presentes em, respectivamente, 94,6% e 97% da amostras, também estavam presentes IgA e IgM em 57,5% e 21,5% respectivamente. Os autores relatam ainda que a IgA estava presente em pacientes com quadro clínico de leishmaniose mucosa, a IgE nos processos iniciais da doença e a IgG, principalmente IgG1 e IgG3, na LC.

Pedras *et al* (2003) avaliaram por ELISA a queda de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG3 específicos para *L. Braziliensis*, em pacientes portadores de LM ou leishmaniose mucocutânea (LMC) antes e após o tratamento. Eles observaram uma diminuição significativa de IgG total aos 90 dias para os pacientes com LM e aos 180 dias para os pacientes com LMC. Uma diminuição significativa de IgG1 aos 180 e de IgG3 aos 90 dias pós-tratamento para LM. Para LCM observaram diminuição significativa de IgG1 e IgG3 até os 180 dias, concluindo que a IgG3 específicos para *L. Braziliensis* é o primeiro anticorpo a ter níveis menores após o tratamento.

Ozbilge *et al* (2006) avaliaram os níveis de IgG e das subclasses de IgG em soros de pacientes com LC através da nefelometria. Eles observaram que os níveis de IgG, IgG1 e IgG3 foram significativamente mais elevados no soro de pacientes com LC ativo do que no soro do grupo controle, e concluem que a avaliação das concentrações destas imunoglobulinas no soro dos pacientes, pode ser utilizada como um marcador de prognóstico para a avaliação de pacientes com LC ativa.

Fagundes-Silva *et al.*, (2012) investigaram a dinâmica da produção de subclasses de IgG na evolução clínica pós-tratamento da LC. Após 24 meses de cura clínica, 73% das amostras foram negativas para IgG1 e 78% foram negativos para IgG3, os autores concluíram então, que a detecção de anticorpos IgG1 e IgG3 séricos anti-*Leishmania* é uma estratégia laboratorial para ajudar na decisão da interrupção do seguimento ambulatorial de pacientes com LC.

1.9 Avaliação de soros através do Western Blotting

O Western blotting é frequentemente usado em pesquisas com o objetivo de separar e identificar proteínas. Nesta técnica, utiliza-se uma mistura de proteínas que são separadas com base no peso molecular e carga por meio de eletroforese em. As proteínas são então, transferidas para uma membrana produzindo uma banda para cada

proteína, promove-se então a marcação de proteínas alvo utilizando anticorpos específicos (MAHMOOD; YANG, 2012).

Masuda *et al* (1989) analisaram a antigenicidade de promastigotas de *L. braziliensis* por imunoblotting, usando para isso soros de diferentes pacientes portadores de LTA, LV, esquistossomose, malária e Doença de Chagas. O soro dos pacientes portadores de LTA reagiu constantemente com a proteína de 60 kDa, diferentemente dos soros dos pacientes portadores das outras doenças (ou enfermidades), os quais não apresentaram reatividade com essa proteína, indicando que a proteína de 60 kDa poderia ser usada para o diagnóstico sorológico de LTA.

Isaza *et al.* (1997) fizeram uma pesquisa para verificar a presença de anticorpos no soro de pacientes no pré-tratamento e no pós-tratamento e concluíram que o método do Western Blot é mais sensível do que a RIFI para detecção de anticorpos anti-leishmânia.

Brito *et al* (2001) compararam as técnicas de imunoblotting, ELISA e imunofluorescência indireta para monitorar a cura clínica de LTA em pacientes infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Uma clara diminuição da reatividade do anticorpo IgG (total) foi observado após a cura clínica para todos os antígenos estudados, com a exceção do antígeno de 19 kDa, cuja frequência de reconhecimento, de fato, aumentou nos pacientes com cura espontânea. Eles sugerem que este antígeno pode desempenhar um papel na imunidade protetora contra a leishmaniose cutânea. As frequências de reconhecimento dos antígenos com maior incidência de reatividade (27 e 30 kDa) diminuíram cerca de 2 vezes em pacientes clinicamente curados, sugerindo que estes poderiam ser úteis como um marcador de cura de LC. Além disso, alguns dos indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas apresentam o mesmo padrão de reatividade em imunoblotting de pacientes com LC ativa, possivelmente representando indivíduos assintomáticos infectados.

Gonçalves *et al* (2002) realizaram western blotting com antígenos derivados de *L. braziliensis* obtendo 41 proteínas principais de *L. braziliensis* com pesos moleculares variando de 13 kDa a 105 kDa. Quando foi feita a aplicação de soro de pacientes com LTA sobre essas membranas, as reações mais frequentes foram com proteínas de peso molecular 48 kDa, 58 kDa e 63 kDa, sendo essa última a que apresentou maior frequência de reação (63,9%) com os soros.

Vidigal *et al* (2008) mostraram boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico da LTA pela técnica de western Blotting utilizando frações antigênicas de

promastigotas de *L. braziliensis* purificadas e soros de pacientes com LTA. A presença de proteínas de peso molecular aparente entre 70 e 72 kDa que foram as mais reativas com os soros de pacientes LTA.

Em uma pesquisa com a técnica de imunoblotting realizada com soros de cães com LTA (*L. braziliensis*), Zanini *et al* (2010) verificaram que existem diferenças entre os padrões de anticorpos (IgG e IgG2) indivíduos assintomáticos e sintomáticos. A ligação dos anticorpos a antígenos de *L. braziliensis* de diferentes massas moleculares foi maior em cães sintomáticos. A ligação ocorreu em 15 proteínas que variavam de 17 a 97 kDa em cães sintomáticos e 4 proteínas de alto peso molecular (66 kDa a 97 kDa) em cães assintomáticos.

Atualmente, as pesquisas buscam identificar marcadores imunológicos que permitam compreender os processos de resistência e cura da LTA, sendo assim, como ainda não foram padronizados critérios objetivos de cura, existe a necessidade de que novos trabalhos sejam desenvolvidos afim de se encontrar melhores suportes para os critérios de cura.

2 JUSTIFICATIVA

Após o tratamento da leishmaniose cutânea, o critério de cura adotado é a cicatrização da lesão. No entanto, este é um critério insatisfatório, já que a reativação de lesões pode ocorrer mesmo após o tratamento (GONTIJO *et al.*, 2003).

Alguns trabalhos já foram realizados utilizando a técnica de citometria de fluxo ou ELISA para verificar a presença de subclasses de IgG no pré e pós-tratamento. De uma maneira geral, foram observados resultados que discriminam a resposta imune humoral antes e após o tratamento (ISAZA *et al.*, 1997; GARCIA *et al.*, 2009), porém, a citometria de fluxo é realizada com aparelhos caros e disponíveis em poucos laboratórios, já o ELISA é uma técnica simples que todos os laboratórios são capazes de realizar.

Alguns autores descrevem que as imunoglobulinas IgG1 e IgG3 desaparecem do soro com a cura clínica dos pacientes (FAGUNDES-SILVA *et al.*, 2012). Assim, espera-se que a detecção de anticorpos IgG3 contra antígenos de leishmânia durante a infecção ativa irão desaparecer mais rapidamente que a IgG total. Somado a isso, a utilização do western blotting pode determinar os antígenos mais ou menos reativos. A combinação da reatividade de IgG3 contra antígenos separados em western blotting poderá gerar resultados úteis para o desenvolvimento de um biomarcador para pacientes portadores de LTA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Identificar diferenças no reconhecimento de proteínas de *L. (V.) braziliensis* por anticorpos IgG totais ou IgG3 obtidos de soro de pacientes com leishmaniose tegumentar americana cutânea antes e após o tratamento.

3.2 Objetivos Específicos.

- 1- Avaliar a reatividade de IgG total ou IgG3 de soro de pacientes com LTA, antes e após o tratamento, com antígenos de extrato bruto de *L. (V.) braziliensis* pela técnica de ELISA.
- 2- Avaliar o perfil de proteínas detectadas por anticorpos IgG total ou IgG3 de soro de pacientes com LTA, antes e após o tratamento, pela técnica de *western blotting*.
- 3- Correlacionar as alterações da reatividade de IgG3 com antígenos de extrato bruto de *L. (V.) braziliensis* observadas no ELISA e *western blotting* dados do paciente.

4 MÉTODOS

4.1 Pacientes e obtenção dos soros

Os pacientes deste estudo foram atendidos no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad (HDT)/GO pela infectologista Dr^a Ledice Inácia Araújo Pereira. O sangue dos pacientes portadores de LTA foi coletado em tubos a vácuo sem anticoagulante para obtenção do soro. O sangue de indivíduos controles foi obtido do banco de sangue do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia. Os soros foram glicerinados com uma parte de glicerol e uma parte de soro e armazenado a -20C até a utilização. Foram incluídos neste estudo apenas soro de pacientes confirmados com a infecção por *Leishmania* sp. de acordo com os dados clínicos epidemiológicos e pela confirmação de pelo menos um dos exames laboratoriais (Presença de amastigotas em lâminas de biópsias ou inprint, IDR_M maior do que 5 mm, reatividade positiva em reação da polimerase em cadeia (PCR) ou título em RIFI > 80). Foram excluídos do estudo soro de pacientes que não foi confirmada a infecção com leishmânia, pacientes com idade inferior a 18 anos, pacientes que já estavam fazendo uso de medicação e também aquele que não foi possível a obtenção dos dados ou soros dos retornos em 6 e 12 ou 18 meses. 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. Soros dos controles sadios foram obtidos do Banco de Sangue do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH). Através dos prontuários dos pacientes, também foram coletados dados epidemiológicos tais como: Sexo, idade, necessidade de retratamento, forma da doença e tempo de cura clínica.

Participaram do estudo 15 pacientes que, após o diagnóstico, foram tratados com o fármaco de primeira escolha, o antimonial petavalente (antimoniato de N-metil glucamina, Glucantime, Aventis, SP, Brazil; 20 mg/kg/dia/20 dias) ou de segunda escolha, a anfotericina B (Anforicin B, Cristália, SP, Brazil; dose total de 1,700 mg). Foram considerados curados (cura clínica) os pacientes com cicatrização das lesões sem

recidiva após 6 meses de acompanhamento. Para controle das reações, foram utilizados soros de 19 pacientes sadios.

4.2 Obtenção de antígenos das formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* e obtenção de extrato protéico total.

O isolado de *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/2003/IMG3c) foi obtida do Banco imunobiológico de leishmanioses da região Centro-Oeste (Leishbank). Os parasitos foram cultivados em meio de Grace (Grace's Insect Medium, Sigma[®] Chemical Co., NY, EUA) suplementado com 20% de SBF (Soro Bovino Fetal, Cripion[®], São Paulo, Brasil) inativado (56 °C por 1 h), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma[®]) em placas de 24 poços (TPP, Suíça) a 26 °C, em estufa B.O.D. [do inglês *Biochemical Oxygen Demand* (Eletro Lab, São Paulo, SP)]. Os parasitos foram repicados para novo meio de cultura a cada dois ou três dias, sempre iniciando a cultura com 1 x 10⁶ promastigotas/mL. Foram utilizados no estudo formas promastigotas em fase estacionária do crescimento (seis dias de cultura). As promastigotas foram lavadas três vezes em PBS e estocadas a -70°C na presença de 1% inibidor de protease (Sigma[®]). Para os ELISAs, 2,5 x 10⁸ parasitos / mL foram lisados por congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C por cinco vezes. Para o western blotting os parasitos foram estocados a -70°C em tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2% SDS) seguindo da lise por congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C por cinco vezes. O extrato proteico foi homogeneizado, aliquoteado em tubos eppendorfs e congelados a -70°C. Para a eletroforese das proteínas, o extrato foi descongelado e diluído em tampão de amostra (62,5 mM Tris pH 6,8; 2,5% SDS; 10% glicerol; 2,5% β-mercaptoetanol; 1% EDTA; 0,015% azul de bromofenol) na proporção de 1:1 e em seguida fervido por 3 minutos. Foram aplicados 3 µL de cada amostra por canaleta nos géis de poliacrilamida-SDS.

4.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A placa para ELISA de alta ligação (JetBiofil[®]) foi sensibilizada com 50 µL de extrato bruto (2,5 x 10⁸ parasitos / ml) de *L. braziliensis* por poço. A placa foi incubada

por 2 horas a 37°C. Ao fim deste tempo, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween e bloqueadas com 150 μ L de solução de bloqueio (3% de SBF em PBS), à temperatura ambiente (T.a.) por 1 h. Depois, as placas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS-Tween e adicionou-se 100 μ L por poço dos soros dos pacientes diluídos 1:100 em solução de bloqueio. As placas foram incubadas por 18 h a 4°C, seguindo-se da lavagem por 3 vezes com PBS-Tween. Posteriormente foram 50 μ L dos anticorpos comerciais anti-IgG3 (1:1000) ou anti-IgG total biotinilado (1:1000) ambos da Sigma® em solução bloqueio por 1 hora t.a.. Após lavar 3x com PBS-Tween foi adicionado aos poços contendo o anticorpo anti-IgG3 50 μ L de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:1000) e aos poços contendo anti-IgG total biotinilado 50 μ L de estreptoavidina conjugada a peroxidase (1:2000) em solução de bloqueio. Após 25 minutos (T.a), as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween e foi adicionada a solução reveladora (TMB), por 20 min (T.a.). A reação foi finalizada com a adição de 20 μ L de ácido sulfúrico 2 N. A leitura das placas foi realizada em leitora de ELISA (MULTISKAN®), utilizando filtro a 550 nm. Em todas as placas foram incluídos soros controles negativos para se fazer a médias da densidade ótica (DO) \pm desvio padrão (DP).

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras

As proteínas de *L. braziliensis* foram separadas em géis de poliacrilamida-SDS de 12% em cuba Mini-Protean (BioRad). As corridas foram realizadas a 100 V, em tampão Tris-glicina (2,4g Tris pH 8,3; 11,52g glicina; 0,1% SDS em 800 ml) por 120 minutos. Como marcadores de peso molecular foram utilizados SeeBlue® Plus2 (NOVEX) (Figura 5)

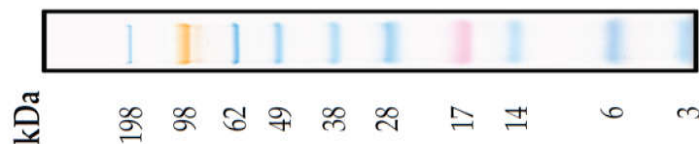


Figura 5. Marcador de peso molecular SeeBlue® Plus2 (NOVEX)

4.5 Western blotting

Para realização do *Western blotting* o extrato protéico total dos parasitos foram fracionados em gel de poliacrilamida-SDS, seguido da transferência semi-seca para membranas de nitrocelulose (Hybond-ECL, Amersham-Pharmacia) em tampão de transferência (5,8g Tris-Base, 2,9g glicina; 0,37g SDS, 200 ml metanol, 1000 ml com água destilada) usando o aparelho “Trans-Blot® SD-Semidry Transfer Cell” (BioRad), a 100 V, por 60 minutos. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (Tris 10 mM pH8; NCl 150 mM; Tween 20 a 0,1%; leite desnatado 5%) por 2 h t.a., sob agitação. As membranas, contendo as proteínas, foram então incubadas com soro dos pacientes, diluídos 1:10 em solução de bloqueio. As membranas foram lavadas 3x com PBS Tween, por 5 minutos e incubadas com anticorpos policlonais de cabra anti-IgG total conjugado peroxidase (1:1000 em solução de bloqueio) por 25 minutos ou com anticorpos policlonais de camundongo anti-IgG3 (1:500 em solução de bloqueio), por 1 hora, a t.a., sob agitação leve. As membranas incubadas com anticorpos anti-IgG3 foram lavadas 3x com PBS Tween por 5 minutos e foram incubadas com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:500 em solução de bloqueio). As membranas foram lavadas 4x com PBS Tween por 5 minutos. A revelação foi feita com DAB pastilha (Sigma).

4.6 Análises estatísticas

Os resultados foram comparados quanto às diferenças dos mesmos através do teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey (comparação múltipla). Foi usado o programa Graph-Pad Prism Software 5.0 (Inc. San Diego, CA, USA). Os resultados estão expressos pela média \pm DP como descrito em cada figura. O nível de significância foi estabelecido com o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Participaram do estudo 15 pacientes com LTA atendidos no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auadi. O diagnóstico foi baseado nos dados clínicos associados aos dados epidemiológicos e a confirmação laboratorial foi feita por pelo menos um dos exames: exame direto (60%), PCR (53,3%), Histopatológico (26,6%), Intradermorreação de Montenegro (≥ 5 mm) (53,3%) ou imunofluorescência (IFI > 80) (6,6%). Os pacientes apresentavam idade entre 20 e 56 anos (média 39,2 anos) e a maioria era do sexo masculino (80%). Quanto a forma clínica da doença, 66,7% apresentavam leishmaniose cutânea, 6,6% leishmaniose cutânea disseminada e 26,7% leishmaniose mucosa. Seis pacientes necessitaram de retratamento e o tempo médio de cura das lesões após o início do tratamento foi de 5,46 meses, variando de 1 a 18 meses para todos os pacientes do estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana

<i>SEXO</i>	
Masculino	12 (80%)
Feminino	3(20%)
<i>IDADE</i>	39,2±11,2
<i>RETRATAMENTO</i>	6(40%)
<i>FORMA DA DOENÇA</i>	
LC	10(66,7%)
LD	1(6,6%)
LM	4(26,7%)
<i>TEMPO MÉDIO DE CURA DAS LESÕES</i>	5,46±5,55 meses

Análise das características dos 15 pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD) e Leishmaniose Mucosa (LM), participantes do estudo

A presença de anticorpos específicos para leishmânia no soro dos pacientes foi analisado por ELISA, diferenciando-se a presença de todas as subclasses de IgG (IgG total) da subclasse IgG3. Na figura 1 pode ser observado que os soros dos pacientes

com leishmaniose, no momento do diagnóstico, apresentavam uma maior quantidade de IgG total (Fig. 6A) e IgG3 (Fig. 6B) do que os controles não infectados. Seis meses após o início do tratamento, observou-se que a IgG total no soro dos pacientes estava maior do que o controle, voltando aos níveis semelhantes aos dos controles apenas 12/18 meses após o início do tratamento. Já a quantidade de IgG3 estava maior do que o controle apenas no momento do diagnóstico, voltando aos níveis semelhantes aos dos controles a partir de 6 meses após o início do tratamento. Quando foi comparada a diferença as DO dos soros dos soros dos pacientes nos diferentes tempos 6 e 12/18 meses não se observou diferença significativa entre eles tanto para IgG total, quanto para IgG3, (Figura 6).

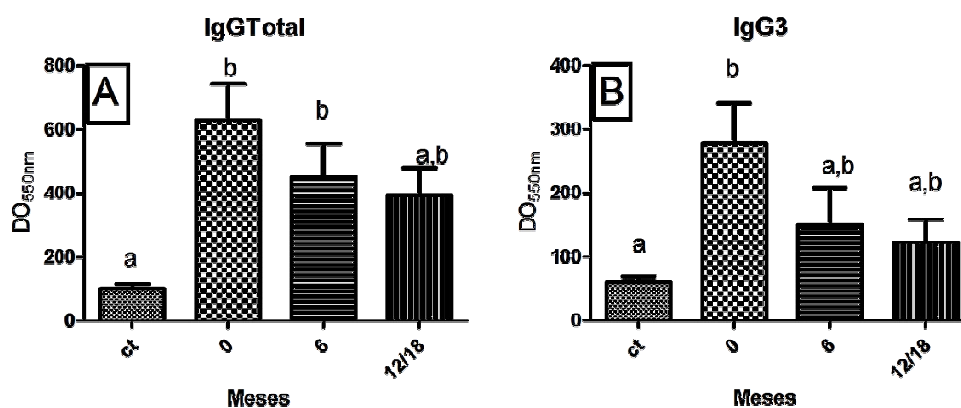


Figura 6. IgG3 específica para leishmânia em soros de pacientes retorna aos valores normais mais rapidamente que IgG total. Soros de pacientes diagnosticados com LTA antes do tratamento (T0) e após o tratamento (6 e 12/18 meses) foram testados quanto à reatividade em ELISA para antígenos de *L. (V.) braziliensis*. As barras indicam média (\pm DP) das absorbâncias. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos medida pelo teste de ANOVA seguido por Tukey ($p < 0.05$).

Estes dados mostraram que a IgG3 regride mais precocemente aos valores normais do que a IgG total. Para verificar se os títulos mais baixos de IgG3 contra leishmânia estavam relacionados com uma cura mais precoce das lesões, os pacientes deste estudo foram divididos em dois grupos, sendo que o grupo A foi composto por pacientes que apresentaram cicatrização da lesão em 1 mês e o grupo B composto por aqueles com cicatrização posterior a 1 mês (Tabela 2).

Pode ser observado na tabela 2 que no grupo A, 57,14 % dos participantes eram do sexo masculino, já no Grupo B 100% eram masculinos, no grupo A a idade média foi de 39,85 anos semelhante com a do grupo B (38,75anos), em relação a

necessidade de retratamento, 1 dos 7 pacientes (14,3 %) necessitaram no Grupo A, já no grupo B 5 (62,5%) dos 8 pacientes foram submetidos a um novo tratamento. Ressalta-se que a única paciente que necessitou retratamento no grupo A possuía um histórico de lesão mucosa de cerca de 10 anos. A forma de leishmaniose predominante no grupo A foi a cutânea (85,7%) e uma paciente (14,3%) apresentou a forma mucosa, no grupo B a forma cutânea foi também a predominante em 50% dos pacientes, seguida da forma mucosa (37,5%) e nesse grupo havia um paciente com a forma cutânea disseminada (12,5%). O tempo médio de cura das lesões serviu de pré-requisito para a divisão dos grupos e dessa forma, o Grupo A teve o tempo médio de cura de 1 mês e o grupo B a média foi de 9,37 meses.

Tabela 2. Características clínicas dos pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana separados em grupos conforme o período de cura clínica

	*Grupo A (n=7)	**Grupo B (n=8)
<i>SEXO</i>		
Masculino	4(57,14%)	8 (100%)
Feminino	3(42,86%)	0(0%)
<i>IDADE</i>	39,85±12,29 anos	38,75±9,44 anos
<i>RETRATAMENTO</i>	1 (14,3%)	5(62,5%)
<i>FORMA DA DOENÇA</i>		
L. Cutânea	6(85,7%)	4(50%)
L. Cutânea Disseminada	0(0%)	1(12,5%)
L. Mucosa	1(14,3%)	3(37,5%)
<i>TEMPO MÉDIO DE CURA DAS LESÕES</i>	1 mês	9,37±4,6 meses

Os pacientes participantes foram divididos em dois grupos tendo como referência o tempo de cura. O grupo A* composto por pacientes que apresentaram cura clínica em 1 mês e grupo B** pacientes que apresentaram cura clínica entre 3 e 18 meses.

Ao analisarmos a quantidade de IgG total específica para antígenos de leishmânia dos pacientes do grupo A (Figura 7A), observa-se que no momento do diagnóstico (T0) houve diferença significativa quando comparada com o controle, porém no tempo 6 e 12/18 meses não houve essa diferença. No grupo B (figura 7B), a quantidade de IgG total em todos os tempos avaliados foi semelhante entre si e diferente do controle. No caso da IgG3 específica para leishmânia, observa-se que no grupo A

(figura 7C) o soro de pacientes e controles possuíam quantidades semelhantes deste isotipo em todos os tempos analisados. Por outro lado, a quantidade de IgG3 no soro dos pacientes do grupo B foi maior que a dos controles no momento do diagnóstico, mas estes anticorpos regrediram para níveis semelhantes aos dos controles após 6 meses de tratamento (figura 7D). Ressaltamos que todos os pacientes deste estudo alcançaram a cura clínica das lesões e que o retorno das DOs de IgG3 aos valores normais precedeu a cura clínica dos grupos, enquanto IgG total manteve-se significativamente mais alta que os controles.

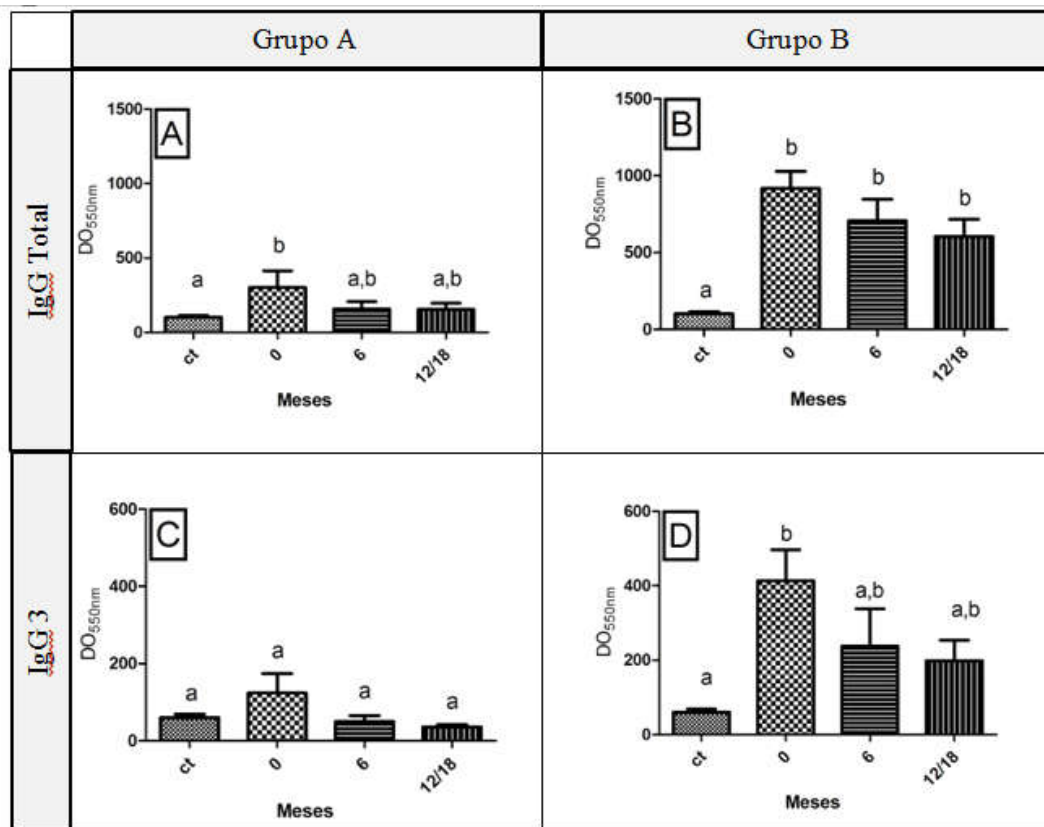


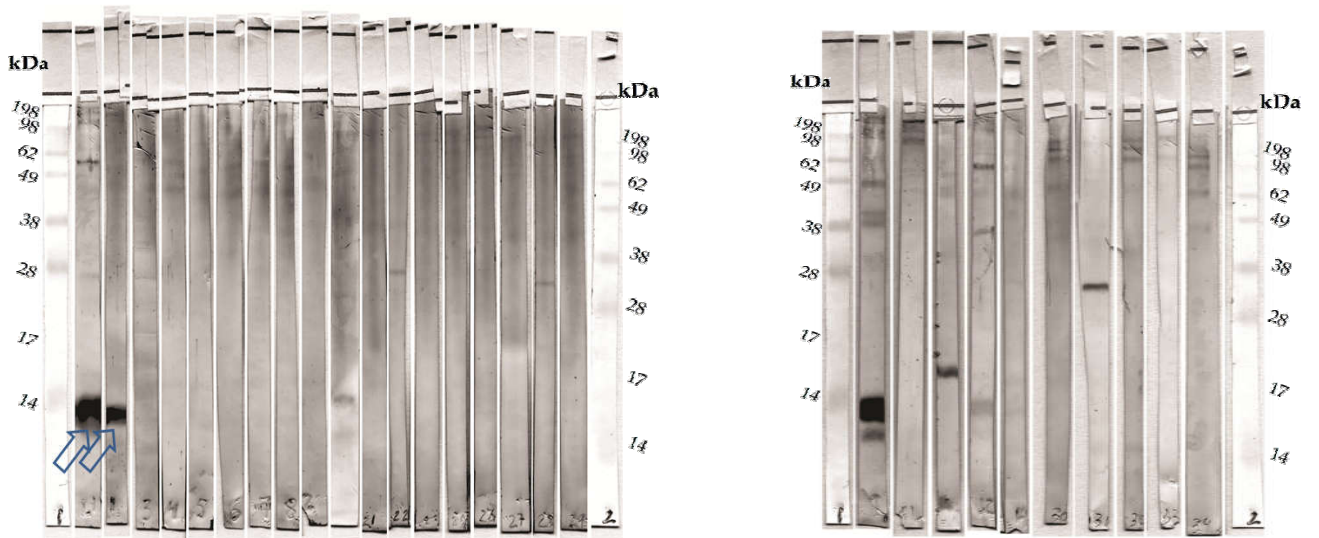
Figura 7.: **Baixa quantidade de IgG3 no momento do diagnóstico está associada a cura mais rápida da lesão.** Soros de pacientes diagnosticados com LTA antes do tratamento (T0) e após o tratamento (6 e 12/18 meses) em dois grupos; A (cura em 1 mês) e B (cura após 1 mês), foram testados quanto à reatividade em ELISA para antígenos de *L. (V.) braziliensis*. As barras indicam média (\pm DP) das absorbâncias. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos medida pelo teste de ANOVA seguido por Tukey ($p < 0.05$).

Como existe variação no reconhecimento dos diferentes antígenos de leishmânia por soro dos indivíduos e devido a possibilidade de maior quantidade de reações

cruzadas ou inespecíficas quando é utilizado antígeno total dos parasitos, resolvemos analisar se existem antígenos reconhecidos pelo isotipo IgG3 que discrimine melhor os pacientes que apresentaram uma cura mais precoce. Inicialmente analisamos se existe alguma proteína dos parasitos que seja mais facilmente reconhecida por soros de indivíduos sadios e verificamos que os 2 controles que apresentaram as maiores DOs para IgG3 também apresentaram no western Blotting reatividade de IgG3 contra um antígeno de aproximadamente 14 kDa e essa reatividade não ocorreu com os controles que apresentaram absorvâncias menores, já para IgG total, essa relação de reatividade com o antígeno de 14 kDa e o valor de absorvância maior não foi verificada. (Figura 8)

IgG3

IgG Total



SORO	CT1	CT2	CT3	CT4	CT5	CT6	CT7	CT8	CT9	CT10	CT11	CT12	CT13	CT15	CT16	CT17	CT18	CT19
ABS (ELISA)	139,2	134,4	133,2	81,6	78	70,8	68,4	58,8	56,4	50,4	45,6	40,8	37,2	28,8	24	22,8	21,6	21,6

SORO	CT2	CT7	CT3	CT1	CT4	CT6	CT8	CT10	CT13	CT17
ABS (ELISA)	222,3	192,4	187,8	127,4	127,4	127,4	102	86,4	81,2	28,6

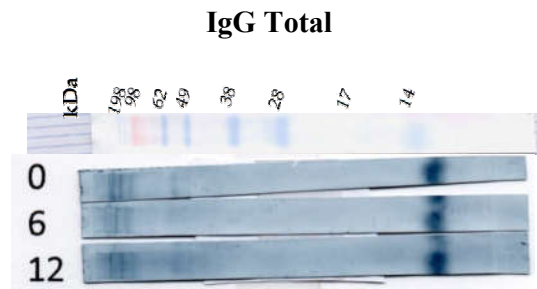
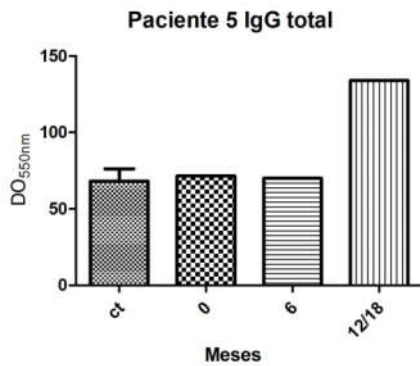
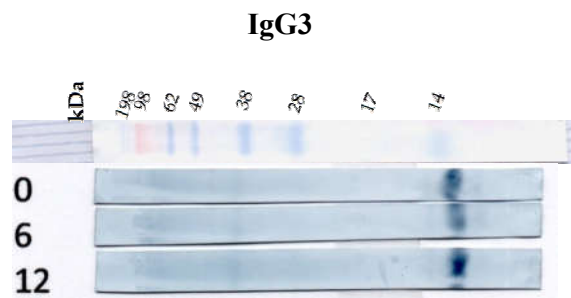
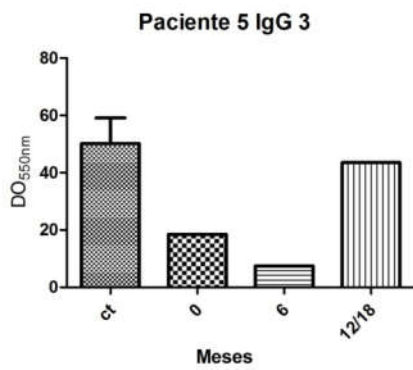
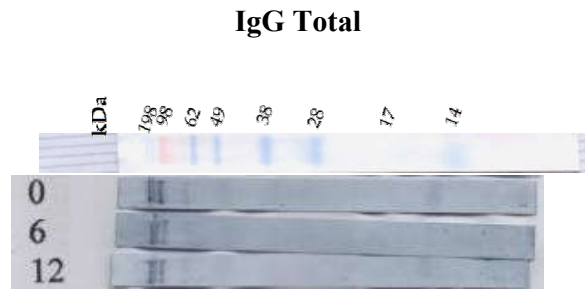
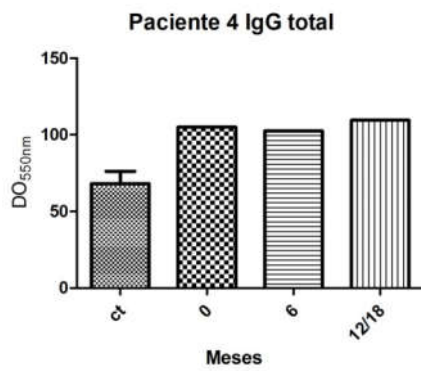
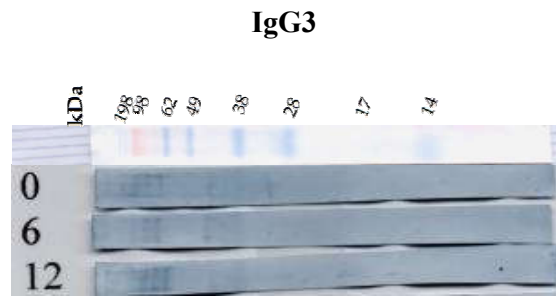
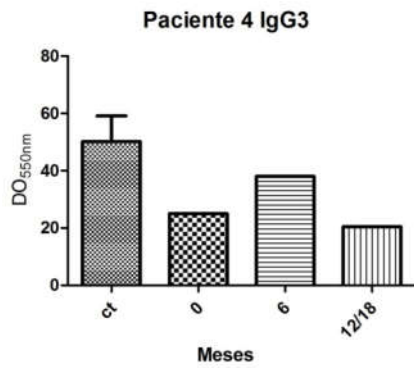
Figura 8. Reatividade das imunoglobulinas (IgG3 e IgG total) com antígenos de *L. (V.) braziliensis* no Western Blotting para controles negativos. Cada fita representa a reatividade de IgG3 ou IgG total contra antígenos totais de *L. (V.) braziliensis*. A primeira e a última fita correspondem ao padrão de peso molecular. No quadro abaixo encontra se a associação com a absorvância detectada no ELISA.

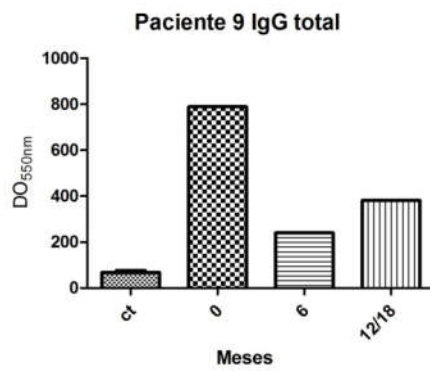
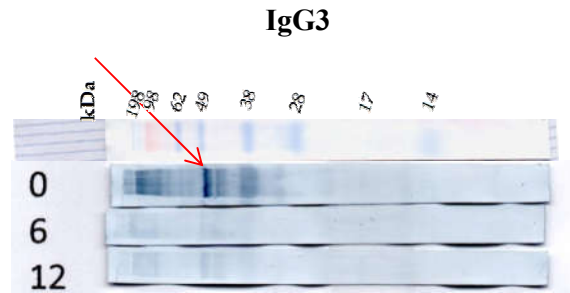
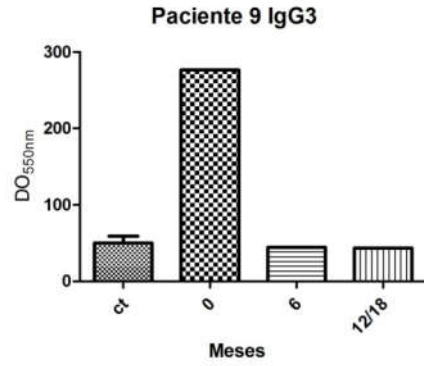
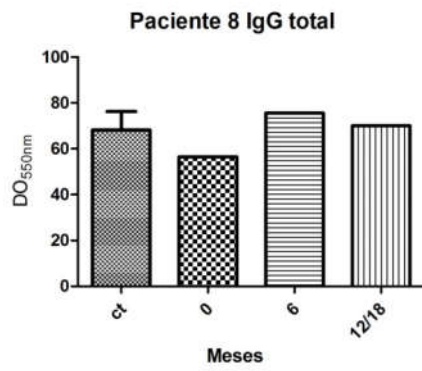
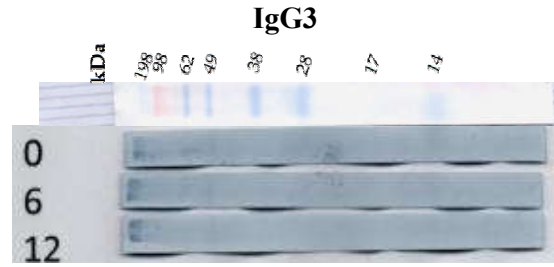
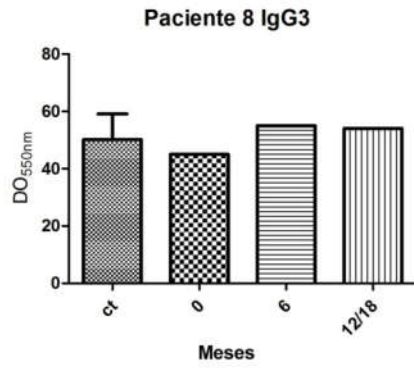
Para verificar quais antígenos reconhecidos pela IgG3 discriminam melhor os pacientes que apresentaram uma cura mais precoce, os antígenos dos parasitos foram separados em eletroforese e revelado com o soro dos pacientes coletados ao longo do tratamento por western blotting (Figura 9).

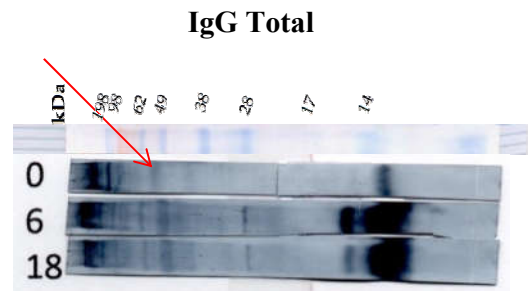
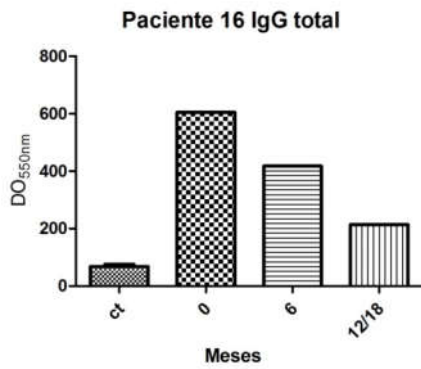
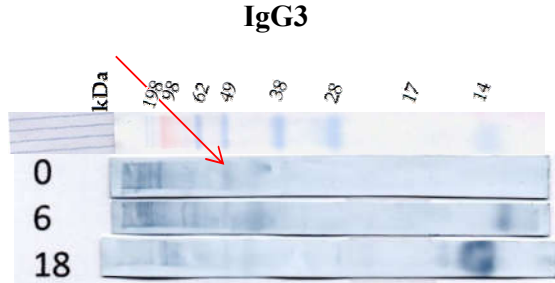
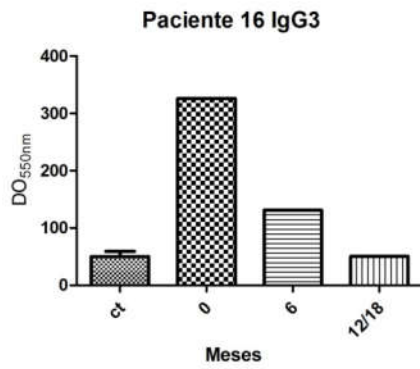
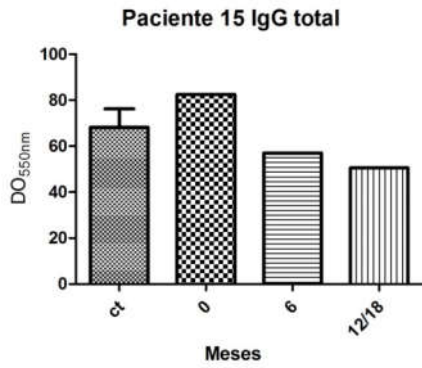
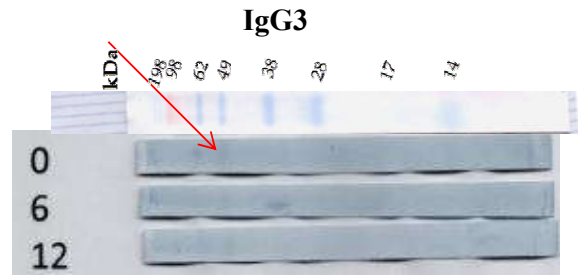
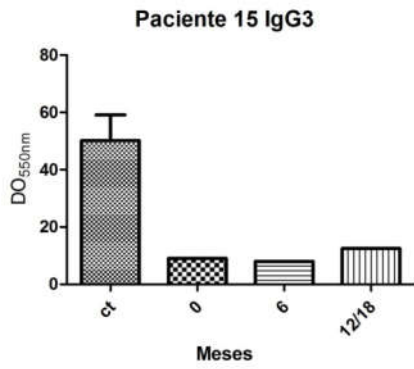
Analisando a reatividade de anticorpos IgG3 aos antígenos de leishmânia de peso molecular próximo de 49 KDa, (Seta fina) no grupo A, observa-se que soros de pelo menos quatro pacientes (9, 15, 16 e 20) reagiram contra este antígeno no momento do diagnóstico. Ressalta-se que em 3 dos 4 pacientes (9, 16 e 20) a DO observada no ELISA para IgG3 contra antígenos totais de leishmânia no tempo zero foi maior que a DO média dos controles mais um desvio padrão. Não foi observada reatividade para estes antígenos nos outros pacientes do Grupo A. Para IgG total no grupo A, com exceção do paciente 4, todos os outros pacientes apresentaram reatividade a este antígeno em um ou mais tempos analisados. No grupo B, todos os pacientes apresentaram reatividade de anticorpos IgG3 e IgG total aos antígenos de peso molecular próximo de 49 KDa. Foi possível observar em ambos os grupos que a intensidade das bandas formadas pela reatividade dos antígenos de leishmania com o anticorpo IgG3 foi aparentemente menor após a cura clínica dos pacientes e essa diminuição aparentemente não é observada para IgG total.

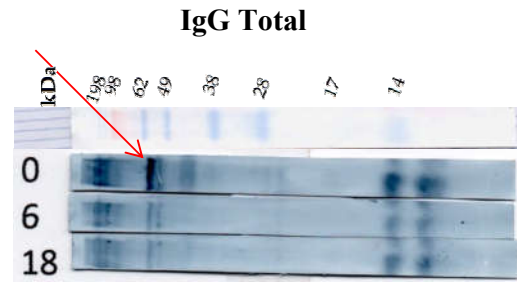
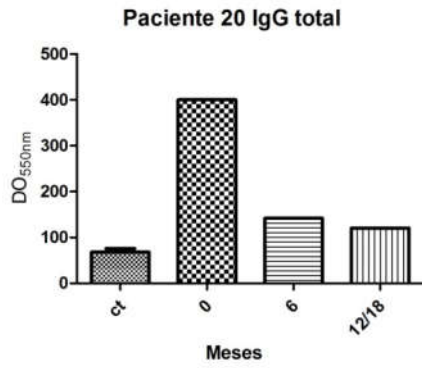
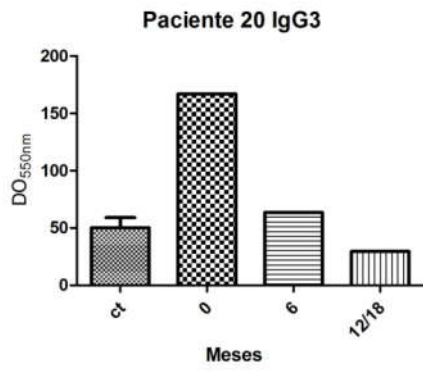
Outro antígeno que chamou a atenção pela reatividade com IgG3 foi o de peso molecular próximo de 28kDa (seta Grossa). Ressalta-se que no grupo A não foi verificada reatividade dos anticorpos dos pacientes a esse antígeno e no grupo B, em todos os pacientes houve reatividade em pelo menos um dos tempos avaliados. Outra observação foi que, em 7 dos 8 pacientes (1, 10, 12, 13, 14, 18 e 19), a intensidade das bandas foi aparentemente maior no momento que antecedeu a cura clínica, ocorrendo, uma diminuição da intensidade após isso. Assim como ocorrido com os antígenos de 49 kDa, a reatividade de antígenos de peso molecular próximo de 28kDa com IgG total não apresentou um padrão homogêneo para análise.

Grupo A (Cura clínica antes de 1 mês)

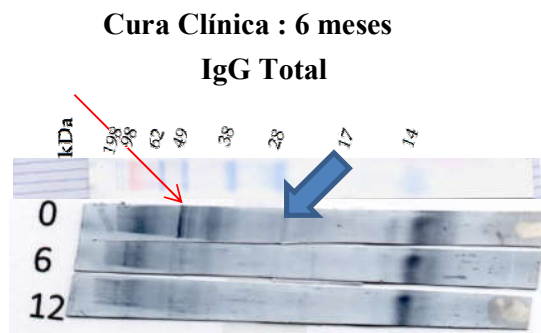
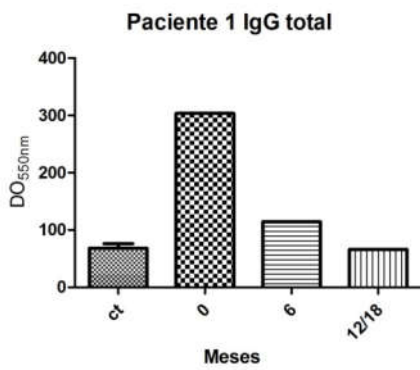
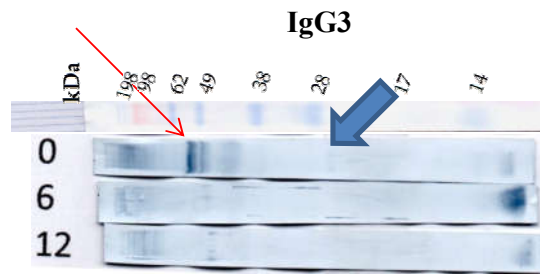
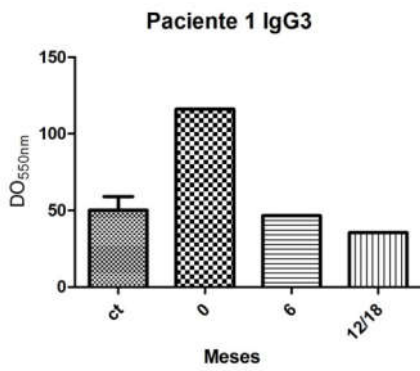


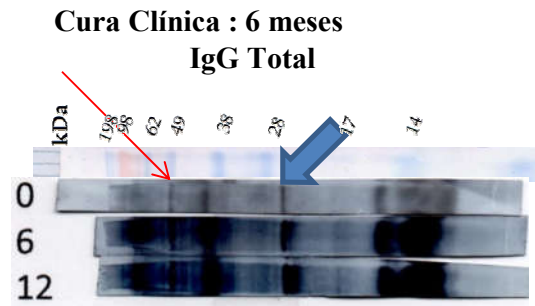
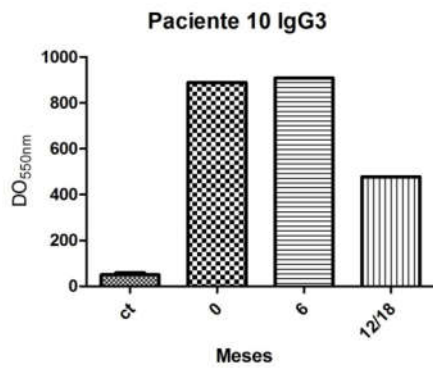
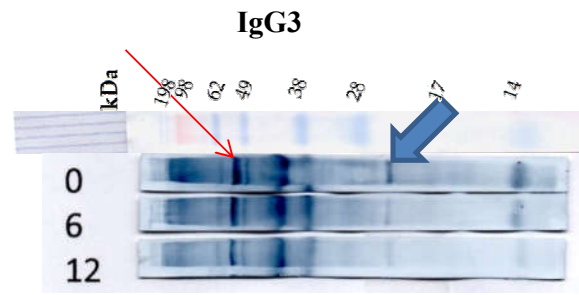
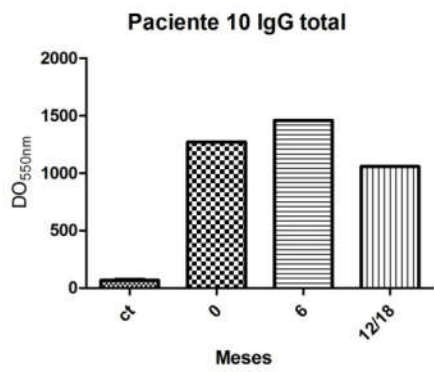
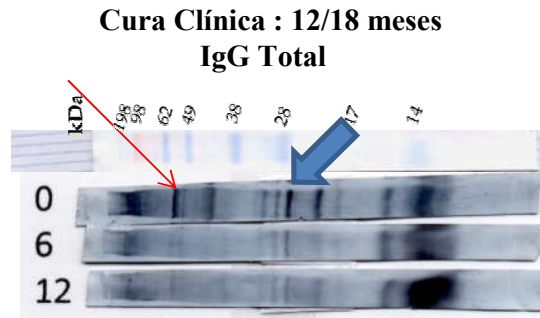
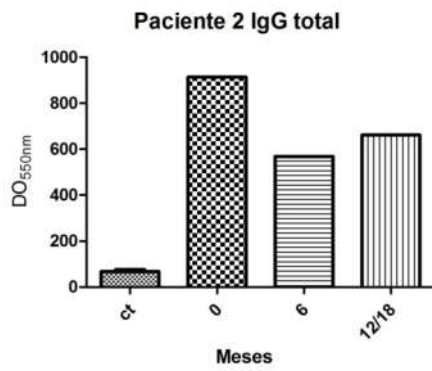
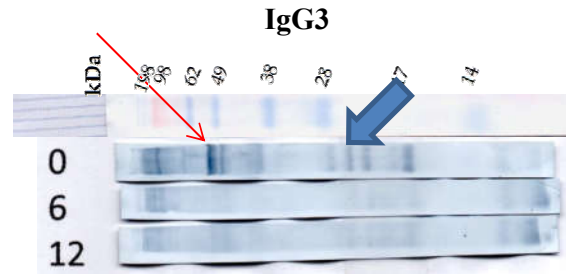
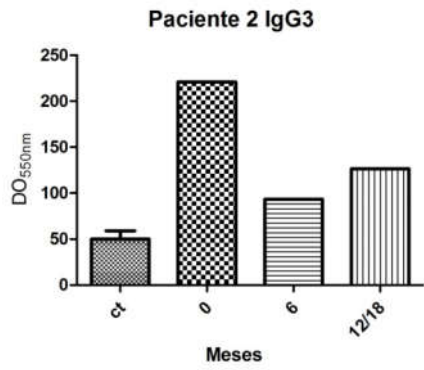




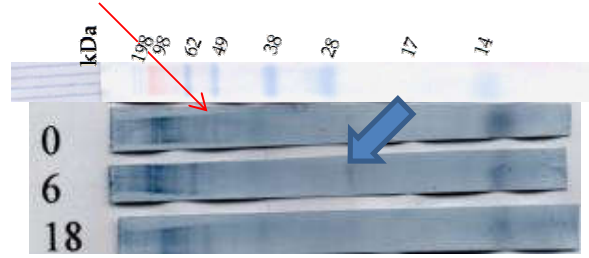
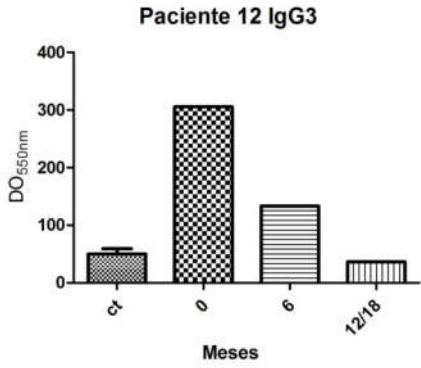


GRUPO B



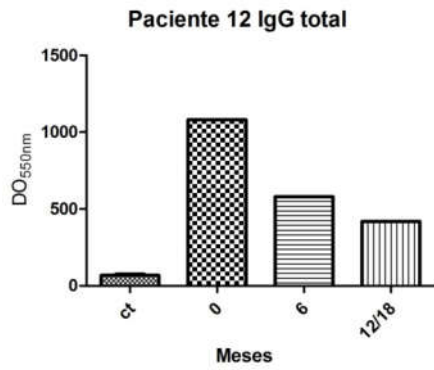


IgG3

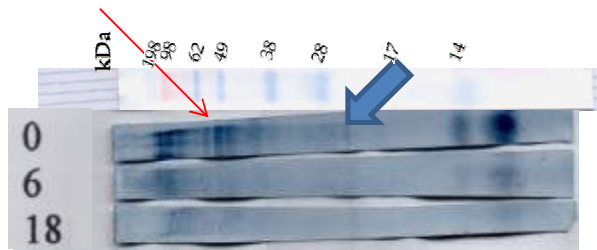
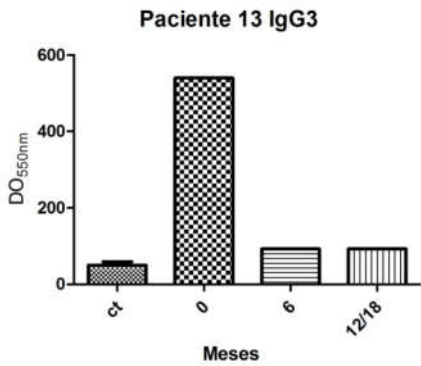


Cura Clínica : 12/18meses

IgG Total

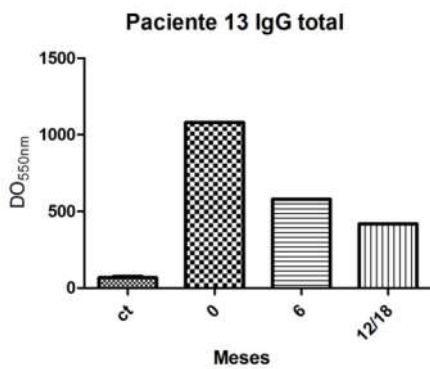


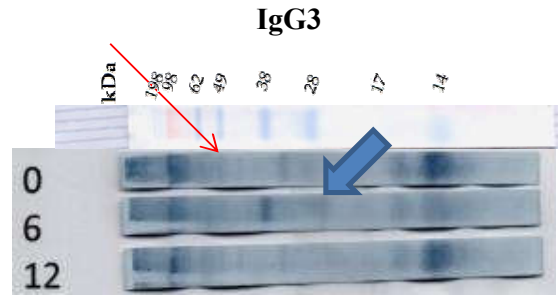
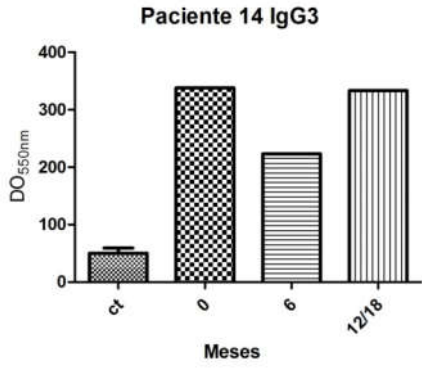
IgG3



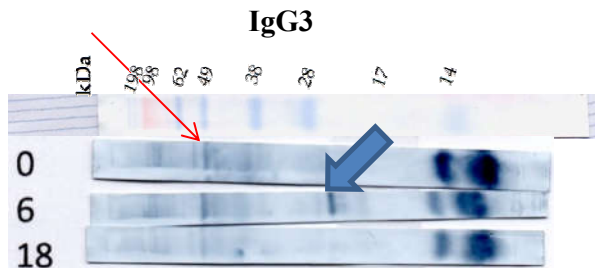
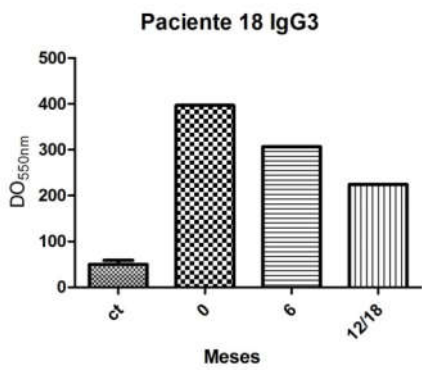
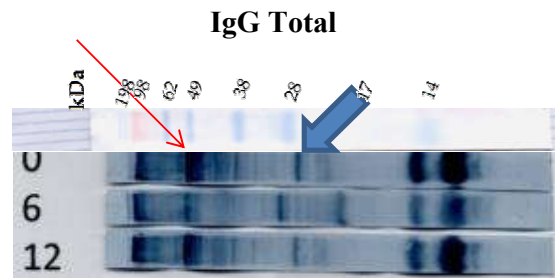
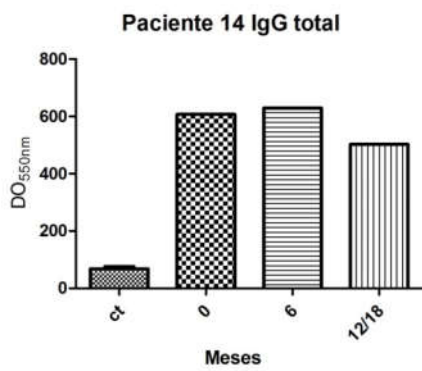
Cura Clínica : 6 meses

IgG Total

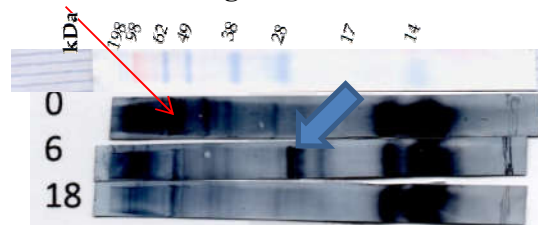
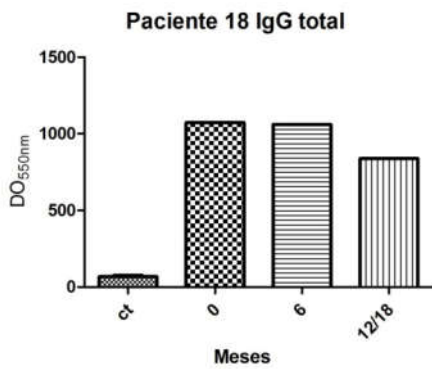




Cura Clínica : 12/18 meses



Cura Clínica : 12/18 meses



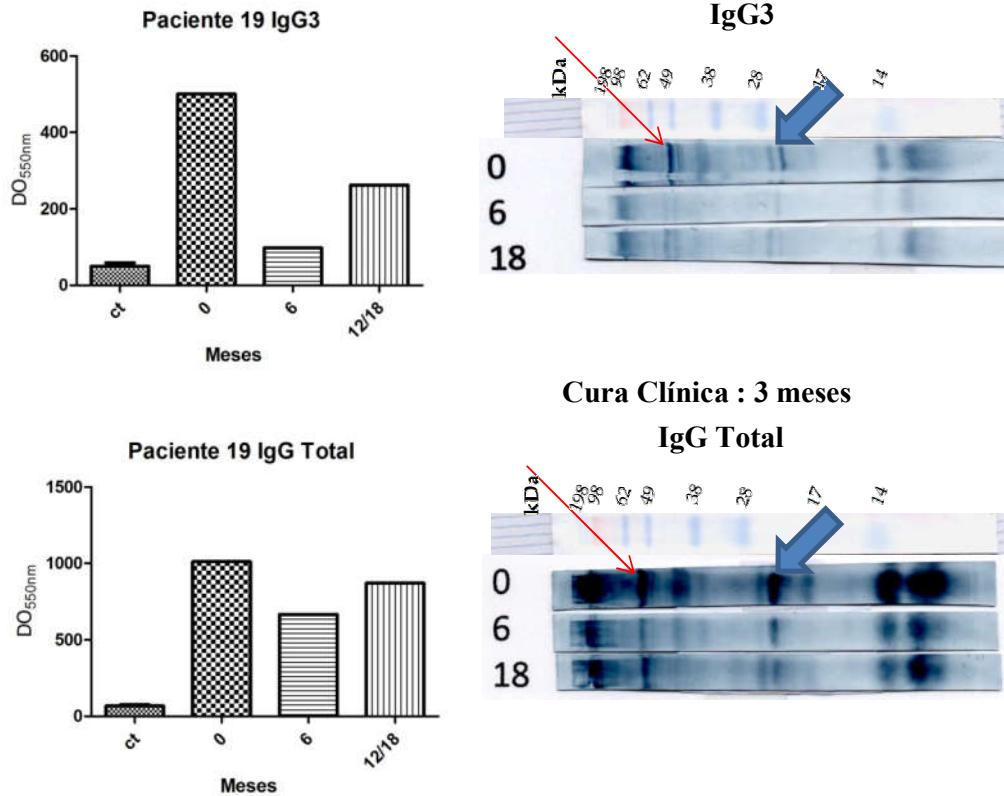


Figura 9. Densidade Ótica no ELISA e a reatividade das imunoglobulinas (IgG3 e IgG total) com antígenos de *L. (V.) braziliensis* no Western Blotting foi menor nos pacientes com cura precoce. O gráfico de barras (esquerda) representa média (\pm DP) das absorvâncias observada no soro de cada paciente ou controle e a figura (direita) representa a reatividade em Western Blotting para antígenos de *L. (V.) braziliensis* pelo soro do mesmo paciente. A seta grossa indica reatividade a antígenos de com peso molecular próximo de 28 kDa e a seta fina representa reatividade a antígenos de antígenos de 49kDa.

6 DISCUSSÃO

Os pacientes portadores de LTA tratados no HDT, em sua maioria, são moradores do interior do Estado, o que dificulta a adesão ao tratamento e os retornos sistemáticos, sendo assim, a pesquisa foi realizada utilizando soros de 15 pacientes, número este, próximo ao utilizado por Gomes *et al* (2010) com soros de 21 pacientes, Fagundes-Silva *et al* (2012) com soros de 23 pacientes e Ozbilge *et al*(2006) com soros de 30 pacientes. Identificamos que os níveis de IgG3 e IgG total nos pacientes antes do tratamento eram maiores que do grupo controle, conforme foi descrito por Pedras *et al* (2003), Souza *et al* (2005), Ozbilge *et al* (2006), Garcia *et al.* (2009), Gomes *et al* (2010) e Fagundes-Silva *et al.*, (2012).

A queda de IgG3 dos soros de pacientes diagnosticados com LTA comparada com a queda de IgG total nos mesmos soros, no decorrer do tratamento analisado pelo ELISA, foi estatisticamente diferente, já que, para IgG3, houve uma queda estatisticamente significativa no tempo de 6 meses e para IgG total a queda foi significativa apenas com 12/18 meses, indicando que a presença de IgG3 específica para *L. (V.) braziliensis* torna-se negativa mais precocemente. Esta observação condiz com os dados apresentados no trabalho de Fagundes-Silva *et al.*, (2012) que demonstrou negatividade de 78% dos soros para IgG3 em 24 meses e em apenas 37% para IgG total no mesmo período.

Comparando os grupos A e B podemos postular que a baixa DO de IgG3 dos pacientes do grupo A no tempo 0 pode indicar uma cura clínica mais rápida (em 30 dias). Esta análise no momento do diagnóstico pode ser uma ferramenta útil para se dar uma atenção maior aos pacientes com DO de IgG3 alta podendo ser aconselhável uso de novos medicamentos ou até associação deles.

A cinética dos anticorpos anti-*leishmania* presentes no soro dos diferentes pacientes variou entre queda, estabilidade e aumento, similar ao ocorrido no trabalho de Fagundes-Silva *et al.* (2012).

Em nossos dados de western blotting para antígenos derivados de *L.braziliensis* foi observado que os soros dos diferentes pacientes não reagiram uniformemente com os

mesmos antígenos e isso também foi observado no estudo de Isaza *et al* (1997) que não encontraram bandas comuns a 100% dos pacientes. No tempo 0, quando reagiram mais intensamente, os principais antígenos reagentes foram de peso molecular entre 198kDa-68 kDa, 49 kDa, 28kDa e 14 kDa diferindo da reatividade dos soros em Western blotting descrita por Gonçalves *et al* (2012) que encontrou reações mais intensas para proteínas de 48kDa, 58kDa e 63kDa. Por outro lado, a reatividade dos soros de pacientes descrita por Vidigal *et al* (2008) foi entre 70 e 72 kDa , por Masuda *et al* (1989) foi para proteínas de 60kDa, Brito *et al* (2001) foi 27 kDa e 30 kDa e Skraba *et al* (2014) para proteínas de 11, 36, e 56-48 kDa. Não está claro porque esta variação no padrão de reconhecimento de proteínas de *leishmania* por indivíduos infectados, porém, isto pode ser influenciado pelo isolado utilizado na preparação do antígeno ou espécie e características dos parasitos e pacientes nas diferentes regiões estudadas. Apesar de poucos trabalhos mostrarem a reação de IgG total com diferentes antígenos de pesos moleculares específicos.

Nos controles, o valor aumentado da absorvância no ELISA de IgG3 contra proteínas de leishmânia e a presença de reatividade de IgG3 contra antígenos de peso molecular de 14kDa podem levar a hipótese de que essa proteína estaria elevando o valor da absorvância no ELISA por reação cruzada, diferindo assim dos valores das maioria dos controles e aumentando o valor da DO média usada como referência para comparação com as DO dos pacientes. A retirada dessa proteína em ensaios de ELISA promoveria então um aumento da qualidade do teste.

Quando analisamos a reatividade a antígenos de 49 kDa, observamos uma aparente diminuição de reatividade de anticorpos após o tratamento, antecedendo a cura dos pacientes nos grupos A e B, sendo que este fenômeno foi mais claro nos pacientes do grupo B. Este dado sugere que essa proteína poderia ser útil em um ELISA para o acompanhamento dos pacientes portadores de LTA, pois poderia revelar a eficiência do tratamento., porém, pesquisas futuras utilizando essa proteína poderiam esclarecer também se em pacientes que não apresentam a cura clínica, ela apresentaria reatividade com IgG3 por períodos mais prolongados

Outro antígenos que apresentaram a reatividade com anticorpos IgG3 que chamou a atenção foi o com peso molecular próximo de 28 kDa, antígeno esse, que também foi descrito no trabalho de Brito *et al* (2001) como um possível marcador de cura clínica já que apresentou frequência de reatividade diminuída em pacientes com cura clínica. Nos pacientes do grupo B, essa reatividade de anticorpos IgG3 com antígenos peso molecular próximo de 28 kDa produziram uma banda aparentemente mais intensa no momento que

antecedeu a cura clinica, que poderia levantar a hipótese que a aparente maior reatividade significaria o aumento de ligações de IgG3 a esse antígeno e após a cura, com a eliminação dos parasitos, a ligação antígeno- IgG3 também diminuiria , produzindo bandas de menor intensidade, ou ausente.

7 CONCLUSÕES

1. Após o tratamento, a reatividade de IgG3 específica para *L. braziliensis* apresentou queda em 6 meses e a IgG total, também específica para *L. braziliensis*, apresentou queda mais lenta em até 12/18 meses.
2. A queda dos títulos de IgG3 e IgG total pode contribuir para a definição do período de acompanhamento clínico do paciente pós tratamento
3. Embora não seja possível demonstrar nos blots uma diferença uniforme de reatividade antes e após o tratamento, as proteínas de peso 49 kDa, 28 kDa e 14 kDa podem ser promissoras para melhorar os resultados do diagnóstico por ELISA
4. Os níveis de IgG3 específicos para a proteína de 49 kDa no momento do diagnóstico pode ser um dado relevante para o prognóstico da doença.

REFERÊNCIAS

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*, 3ª ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2009.

Alvar, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One**, vol.7, n.5, p.1-12, 2012.

Brasil, Ministério da Saúde, Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde M.S. Brasília, 2006.

Brasil, Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde 2007

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 7. ed., 2009

Brito, M.E. et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Vol.7, n. 2, p.318- 21, Mar, 2000.

Brito, M.E. et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** vol. 95, n. 2, p.203-6, Mar-Apr, 2001.

Celeste, B.J. et al. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, vol. 37, n. 11, p.1591-3, Nov, 2004.

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 Immunol.** vol.34, n.10, p.486-91, Oct, 2012.

Garcia, L.M. et al. Anti-fixed Leishmania chagasi promastigotes IgG antibodies detected by flow cytometry (FC-AFPA-IgG) as a tool for serodiagnosis and for post-therapeutic cure assessment in American visceral leishmaniasis. **J Immunol Methods.** vol.350, n.(1-2),p.36-45, 2009

Gomes, I.T. et al. Anti-Leishmania chagasi immunoglobulin G3 detected by flow cytometry for early cure assessment in American visceral leishmaniasis. **Journal of Immunological Methods**, vol.360, n.1-2, p.76-83, Aug, 2010.

Gonçalves, C.C. et al. Evaluation of antigens from various Leishmania species in a Western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** vol.66, n.1, p.91-101, 2002.

Gontijo, C.M. et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Trop.** vol.81, n. 2, p.143-50, Feb, 2002.

Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Bras Med Trop.** vol.36, n. 1, p.71-80, jan-fev, 2003

Grevelink, S.A.; Lerner, E.A. Leishmaniasis. **J Am Acad Dermatol.** vol.34, n.2 p.257-72, Feb, 1996.

Isaza, D.M.; Restrepo, M.; Mosca, W. Immunoblot analysis of Leishmania panamensis antigens in sera of patients with American cutaneous leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.** vol.35, n.12, p.3043-7, Dec , 1997.

Mahmood, T.; Yang, P.-C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. **N Am J Med Sci.** vol.4, n.9, p.429–434, Sep, 2012.

Mendonça, M.G. et al. Persistence of Leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? **J Infect Dis.** vol.189, p.1018–23, 2004.

Molyneux, D. H.; Killick-Kendrick, R.; Morphology, ultrastructure and life cycles, p. 121–176. In W. Peters and R. Killick-Kendrick R. Leishmaniasis in biology and medicine, Biology and epidemiology. Academic Press, New York, N.Y, vol. 1, 1987.

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

Passos, V.M. et al. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. **Bull World Health Organ**, Vol.78, n.8, p. 968-74, 2000.

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

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 in localized cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol.74, p.292–298, 2012.

Pissinate, J.F. et al. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-Leishmania immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Journal of Immunological Methods**, vol.336, p.193–202, 2008.

Reis, L.C. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Rev Patol Trop**, vol.35, n.2, p. 103-115, 2006.

Reithinger, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.**, vol.7, n.9, p.581-96, Sep, 2007.

Rocha, R.D. et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, vol.35, n.6, p. 551-62, Nov-Dec, 2002.

Rocha, R.D. et al. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. **Trop. Med. Int. Health.**, vol.11, n.2, p.156-66, Feb, 2006.

Rougeron, V. et al. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. **Proc Natl Acad Sci.** vol.106, n.25, p.10224-9, 2009.

Ryan, J.R. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.** vol. 40, n.3, p.1037-43, Mar, 2002.

Skraba, C.M. et al. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol.78, p.411–417, 2014.

Souza, M.A. et al. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** vol.38, n.2, p.137-141, mar-abr, 2005.

Vexenat, A. de C., Santana, J.M., Teixeira, A.R. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop.** vol.38, n.3, p.177-85, May-Jun, 1996.

Vidigal C. P. et al. Enzyme immunoassay using *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigens for laboratorial diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.** vol.107, n.2, p.208-12, Aug, 2008.

Zanini, M.S. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Immunoblotting analysis for the detection of IgG subclasses in the diagnosis of symptomatic and asymptomatic dogs .**Veterinary Parasitology**. vol.173, p.143–146, 2010.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE



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 Tropicais e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás/GO; Ambulatório de leishmaniose do Hospital Anuar Auad (HDT/Goiania/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*

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre 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