



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO ESTUDO DA RESPOSTA
IMUNE DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

ALLANA MARIA DE SOUZA PEREIRA

RECIFE-PE

2019

ALLANA MARIA DE SOUZA PEREIRA

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO ESTUDO DA RESPOSTA
IMUNE DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandes

RECIFE-PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

P436a Pereira, Allana Maria de Souza

Aplicação da citometria de fluxo no estudo da resposta imune de pacientes com leishmaniose tegumentar americana / Allana Maria de Souza Pereira. – 2019.

77 f. : il.

Orientadora: Valéria Pereira Hernandes.

Coorientadora: Beatriz Coutinho de Oliveira.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências.

1. Imunologia 2 . Leishmania braziliensis 3. Diagnóstico
I. Hernandes, Valéria Pereira, orient. II. Oliveira, Beatriz Coutinho, coorient. III. Título

CDD 574

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO ESTUDO DA RESPOSTA
IMUNE DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

ALLANA MARIA DE SOUZA PEREIRA

Data de apresentação: 04 de Fevereiro de 2019

Nota: _____

Orientadora: _____

Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandes/IAM-FIOCRUZ-

Examinador (a): _____

Titular: Profa. Dra. Yone Vila Nova Cavalcanti – UFRPE

Examinador (a): _____

Titular: Dra. Aline Caroline da Silva Santos – IAM-FIOCRUZ

Examinador (a): _____

Suplente: Dr. Thiago André Ramos dos Santos – UNIFG

Recife – PE

2019

Dedico aos meus pais e minha irmã
Lorena.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pois sem ele nada disso seria possível. Sempre presente nos momentos bons e principalmente nos momentos mais difíceis, cuidando de mim e me dando forças para que eu nunca desistisse de lutar. Sei que estou aqui hoje porque Ele sempre cuidou e preparou tudo, e por isso entrego toda a minha vida nas mãos Dele.

Aos meus pais e minha irmã Lorena, por ser a minha base, e por serem os melhores pais e irmã que eu poderia ter. Sempre ao meu lado e me apoiando em cada passo e decisão tomada. Agradeço a vocês por serem meus amigos e por todos os ensinamentos, conselhos e sacrifícios que fizeram para me proporcionar todas as oportunidades que tive para chegar onde estou sem vocês a minha vida não teria sentido.

Ao meu avô (*in memoriam* Inácio), sei que o senhor está muito orgulhoso por mais essa conquista na minha vida. Saudades imensas!

As minhas avós Lúcia e Edite e todos os meus tios, tias e primos por todo amor e apoio que me deram.

A minha prima Gabi por ser minha irmã/parceira de vida, que sempre me apoia, me escuta, conversa comigo por horas e até me acompanha no laboratório nos finais de semana. Você é essencial na minha vida, te amo.

A minha amiga de infância Adri que sempre esteve ao meu lado, me dando conselhos e me apoiando. Amo você!

As minhas amigas Carol e Nathalia, nosso trio original que já passou por tantas e continua firme e forte. Fomos a força uma da outra em momentos não tão bons na nossa vida e hoje agradeço por ter passado por tudo isso ao lado de vocês. E mesmo que a gente só se veja em aniversários e na confraternização de fim de ano sei que vocês estão sempre presentes, amo vocês e obrigada.

Aos meus biólogos favoritos no mundo inteiro (Gabi, Gus, Igor, Yasmin e Ana C). Esses últimos anos foram incríveis, muitas viagens e experiências compartilhadas. Amo vocês e obrigada por todo apoio e força que vocês me deram, ganhei amigos para toda a vida.

A minha amiga/gêmea Gabi por me conhecer e me apoiar tanto ao longo desses anos tão intensos. Nossa amizade só cresceu e se fortaleceu e encontrei em você alguém que partilha dos mesmos sonhos, amor por tubarões e sei que vamos conhecer esse mundo todo ainda. Amo você.

A minha orientadora Valéria, muito obrigada por ser essa pessoa incrível que Deus colocou em minha vida. Sempre cuidando, ajudando e me orientando da melhor maneira. Sou muito grata por fazer parte do seu grupo.

Agradeço também a minha co-orientadora Beatriz, que me ensinou tanto ao longo desses anos, sempre muito atenciosa me ajudando em tudo o que eu precisava, corrigindo meus relatórios, passando horas no citômetro e estava comigo até quando ficamos presas no elevador! Você se tornou uma grande amiga, muito obrigada por tudo.

A todos os meus colegas de laboratório do IAM: Ailton, Sophia, Carol, Ana, Mayara, Aline, Carla, Marthon e Esther, é sempre muito bom trabalhar com todos vocês.

A Dra Edi, por toda colaboração junto ao Serviço de Referencia em Leishmaniose e por todos os conselhos e ensinamentos.

Ao Instituto Aggeu Magalhães por toda infraestrutura cedida para realização do trabalho.

A todos os professores da graduação da UFRPE, principalmente os professores Marcos Souto, Paula Braga, Ana Carla, Mauro de Melo e José Victor, por todo conhecimento e experiências sobre a Biologia passada ao longo dos anos, que fizeram a paixão por essa área só aumentar.

A todos aqueles que não foram citados, mas contribuíram para esse trabalho acontecer. Muito obrigada.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, com média de 1,3 milhões de casos anuais. O Brasil apresenta a maior prevalência em notificações nas Américas e o agente específico é a espécie *L. (V.) braziliensis*. O diagnóstico é comumente realizado por uma associação de fatores clínicos, epidemiológicos e testes laboratoriais. As técnicas de abordagens imunológicas mais utilizadas na rotina laboratorial são a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), porém, podem apresentar limitações. Com isso, abordagens imunológicas alternativas vêm sendo estudadas, e uma delas é a citometria de fluxo (CF). Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar através da citometria de fluxo, a participação da resposta imune humoral no desenvolvimento de lesões cutâneas em indivíduos com a doença ativa antes do tratamento (AT), e naqueles curados após o tratamento (PT). As amostras de soro utilizadas para os testes foram inativadas. Para os ensaios de CF formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* obtidas a partir da cepa de referência, foram expandidas em meio Schneider's até atingirem a fase exponencial. Após etapas de lavagem, a concentração de parasitos foi ajustada e fixada no paraformaldeído a 1%. Para os ensaios de IFI e ELISA foram utilizados os抗ígenos totais da *L. (V.) braziliensis*. Para a CF e a IFI o anticorpo foi conjugado a um fluorocromo e no ELISA a uma enzima. Como resultados dos ensaios de IFI, dos soros avaliados, 92,85% (13/14) foram positivos AT, 61,54% (8/13) um ano, 70% (7/10) dois anos e 50% (5/10) cinco anos PT foram positivos. No teste de ELISA, 92,8% (13/14) dos pacientes AT foram positivos; e 53,8% (7/13) um ano PT, 88,8% (8/9) dois anos PT e 100% (5/5) cinco anos PT (5/5) continuaram com título positivo para LTA. Para a CF, foram identificados como positivos 86% (12/14) dos pacientes AT e 77% (10/13), 80% (8/10) e 70% (7/10) dos indivíduos, respectivamente, um, dois e cinco anos PT foram negativos para o ensaio de CF. Com a análise das curvas ROC comparando a performance dos três testes, observou-se que área sob a curva (ASC) da IFI ($ASC=0,879$; $IC_{95\%}=0,754-0,954$) foi menor do que o teste de citometria de fluxo ($ASC=0,890$; $IC_{95\%}=0,767-0,961$), compreendendo um desempenho menor em relação à citometria. Para comparação entre o ELISA e a CF se observou que área sob a curva (ASC) do ELISA ($ASC=0,808$; $IC_{95\%}=0,652-0,915$) diferiu da observada para o teste de CF ($ASC=0,896$; $IC_{95\%}=0,758-0,970$), onde novamente a CF apresentou um desempenho superior. Com os resultados obtidos da padronização dos isótipos IgG1, IgG2 e IgG3, pôde-se observar que a melhor diluição do isótipo IgG1 foi a diluição 1:400, para o isótipo IgG2, 1:100 e para o isótipo IgG3, 1:200. Na análise da aplicabilidade do isótipo IgG1, foi constatado que AT, 63,2% dos pacientes foram positivos e para os pacientes 1PT, 17,7%; 2PT, 72,8% e 5PT, 12,55% se apresentaram positivos. Dessa forma acredita-se que citometria de fluxo aplica-se ao diagnóstico da LTA por apresentar resultados positivos na presença da doença, sendo superior aos dois testes utilizados na rotina laboratorial para LTA e que a utilização do isótipo IgG1 tem amplas possibilidades para contribuir como um método de diagnóstico mais sensível e específico do que os métodos tradicionais.

Palavras-chaves: *L. (V.) braziliensis*; Diagnóstico; Isótipos

ABSTRACT

The American tegumentary leishmaniasis (ATL) is an infectious, non-contagious disease with an average of 1.3 million annual cases. Brazil shows the highest prevalence in number of reported cases in the Americas, where the specific agent is the species *L. (V.) braziliensis*. The diagnosis is commonly performed by an association of clinical, epidemiological and laboratorial tests. The immunological approaches which are most commonly used in the routine are the indirect immunofluorescence (IFI) and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), however, they may present limitations. Therefore, alternative methods have been studied, and one of them is flow cytometry (FC). Thus, the aim of this work is to evaluate, by flow cytometry, the role of the humoral response in the development of cutaneous lesions of patients with the active disease before treatment (BT), and in those healed after therapeutic intervention (PT). Sera samples were inactivated. For the FC assays, promastigote forms of *L. (V.) braziliensis* obtained by the reference strain were expanded in Schneider's medium until they reached exponential phase. After washing protocols, the concentration of the parasites was adjusted and they were fixed with 1% paraphormaldehyde. For the IFI and ELISA assays, the total antigen of *L. (V.) braziliensis* were used. In FC and IFI assays, the IgG antibody was conjugated to a fluorophore and in ELISA, to an enzyme. Regarding IFI results, from the evaluated sera, 92.85% (13/14) were positive on BT group, 61.54% (8/13) were positive 1 year PT, 70% (7/10) 2 years PT and 50% (5/10) 5 years PT were positive. In ELISA, 92.8% (13/14) of BT patients were positive; and 53.8% (7/13) 1 year PT, 88.8% (8/9) 2 years PT and 100% (5/5) 5 years PT (5/5) remained positive for ATL. In FC, 86% (12/14) of BT patients were positive and 77% (10/13), 80% (8/10) and 70% (7/10) of the patients 1, 2 and 5 PT, respectively, were negative for the assay. Based on the ROC curves analysis to compare the performance of the 3 tests, it was observed that the area under the curve (AUC) of IFI (AUC=0.879; IC_{95%}= 0.754-0.954) was lower than FC's (AUC= 0.890; IC_{95%}=0.767-0.961), meaning it had a lower performance. Comparing ELISA and FC, it was observed that the AUC of ELISA (AUC=0.808; IC_{95%}= 0.652-0.915) has differed from the one observed for FC (AUC= 0.896; IC_{95%}= 0.758-0.970), where again, FC has shown a superior performance. As for the results of the IgG isotypes' (IgG1, IgG2 and IgG3) standardization, it was observed that the best dilution for IgG1 was 1:400; for IgG2, 1:100; and for IgG3, 1:200. On the analysis to verify IgG1 applicability, it was seen that BT 63.2% of the patients were positive, and 1PT, 17.7%; 2PT, 72.8% and 5PT, 12.55% of the patients were positive. Therefore, we believe that FC can be used as a diagnostic tool for ATL since it is positive in the presence of the disease, being superior to the two conventional methods used in the laboratory routine. Also, the use of the IgG1 isotype has the ability to contribute as a more sensitive and specific diagnostic method when compared to the classical ones.

Keywords: *L. (V.) braziliensis*; Diagnosis; Isotypes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas evolutivas do parasito <i>Leishmania spp.</i>	5
Figura 2 - Ciclo de vida da <i>Leishmania spp.</i>	7
Figura 3 - Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana	8
Figura 4 - Histogramas da porcentagem de parasitas fluorescentes positivos	28
Figura 5- Curvas de titulação de anticorpos IgG anti-formas promastigotas de <i>L.(V.) braziliensis</i> presentes nos soros dos pacientes	28
Figura 6 - Curvas de sensibilidade e especificidade da citometria de fluxo.....	29
Figura 7- Avaliação da aplicabilidade do ensaio de citometria de fluxo utilizando o anticorpo IgG na identificação de pacientes com LTA ativa.	30
Figura 8 - Avaliação da aplicabilidade do ensaio de citometria de fluxo na identificação de pacientes após o tratamento	33
Figura 9 – Resultados da IFI para avaliar a reatividade IgG em soros de pacientes antes e após o tratamento	35
Figura 10 – Resultados do ELISA para avaliar a reatividade IgG em soros de pacientes antes e após o tratamento.....	35
Figura 11- Comparação entre as curvas ROC de IFI e citometria de fluxo	35
Figura 12 - Comparação entre as curvas ROC de ELISA e Citometria de Fluxo	35
Figura 13 - Padronização do Conjugado para o ensaio do isotipo IgG1	35
Figura 14 - Curvas de titulação do isotipo IgG1	35
Figura 15 - Avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG1 para CF	35
Figura 16 - Curva ROC para o isotipo IgG1	40
Figura 17 - Padronização do conjugado para o ensaio do isotipo IgG2	41
Figura 18 - Curvas de titulação do isotipo IgG2	41
Figura 19 - Padronização do conjugado para o ensaio do isotipo IgG3.	42
Figura 20 - Curvas de titulação do isotipo IgG3	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e limitações dos testes imunológicos no diagnóstico das leishmanioses.....	16
Tabela 2 - Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes.....	26
Tabela 3 - Resultados dos exames laboratoriais dos pacientes	27
Tabela 4 - Resultados do teste de imunofluorescência indireta dos pacientes antes e após o tratamento com Glucantime®	34
Tabela 5 - Resultados do teste de ELISA dos pacientes antes e após tratamento com Glucantime® expressos em inverso do título da diluição	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- LTA – Leishmaniose tegumentar americana
CF – Citometria de fluxo
IFI – Imunoinfluorescência indireta
ELISA – Ensaio imunoenzimático
IgG – Imunoglobulina G
APCs – Células apresentadoras de抗ígenos
IL – Interleucina
LC – Leishmaniose cutânea
LM – Leishmaniose mucocutânea
DC – Células dendríticas
Treg – Células T regulatórias
LIT – Liver Infusion Triptose
IDRM – Teste de intradermorreação de Montenegro
LV – Leishmaniose visceral
LCL – Leishmaniose cutânea localizada
LCD – Leishmaniose cutânea difusa
OMS – Organização Mundial da Saúde
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
AT – Antes do tratamento
PT – Pós-tratamento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
2.1Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana	4
2.2.Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana	7
2.3.Resposta imune na Leishmaniose Tegumentar Americana	9
2.4.Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana	11
2.4.1. Testes Parasitológicos	12
2.4.2. Testes Moleculares	14
2.4.3. Testes Imunológicos	14
2.5.Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana	17
2.6.Critério de cura da Leishmaniose Tegumentar Americana	18
3. OBJETIVOS	20
3.1.Geral	20
3.2.Específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1.Processo de seleção da população estudada	21
4.2.Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes	21
4.3.Obtenção do soro	21
4.4.Obtenção das formas promastigotas da <i>L.(V.) braziliensis</i>	22
4.5.Obtenção do antígeno total de <i>L.(V.) braziliensis</i> para IFI e ELISA.....	22
4.6.Reação de Imunofluorescência indireta.....	23
4.7.Reação de ELISA	23
4.8. Ensaio de Citometria de Fluxo para pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas de <i>L.(V.) braziliensis</i>	24
4.8.1. Análise de dados	24
4.9.Análises estatísticas	25
5. RESULTADOS	26
5.1.Caracterização da população de estudo e resultados laboratoriais	26
5.2.Citometria de fluxo.....	27
5.2.1. Padronização de IgG total – Curvas de titulação	28
5.2.2. Curva ROC – Avaliação do ponto de corte	28

5.2.3. Aplicabilidade do isotipo IgG total em identificar pacientes com LTA ativa	29
5.2.4. Aplicabilidade da Citometria de fluxo em identificar pacientes antes e após o tratamento	30
5.3. Imunofluorescência Indireta	31
5.4. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	33
5.5. Análise das curvas ROC entre IFI e Citometria de Fluxo	35
5.6. Análise das curvas ROC entre ELISA e Citometria de fluxo	36
5.7. Padronização do isotipo IgG1	37
5.7.1. Avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG1	39
5.7.2. Estudo da curva ROC – Isotipo IgG1	39
5.8. Padronização do isotipo IgG2	40
5.9. Padronização do isotipo IgG3	42
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) pode ser causada por diversas espécies de protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. No Brasil existe uma incidência de seis espécies causadoras de LTA, divididas nos subgêneros *Leishmania* (L.) e *Viannia* (V.), são elas: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsoni* e *Leishmania (L.) amazonensis*. Dentre essas espécies, a *Leishmania (V.) braziliensis* é considerada o agente específico da LTA no Brasil devido ao grande número de casos (CROFT; COOMS, 2003; TIUMAN *et al.*, 2011).

A doença é transmitida por artrópodes hematófagos de diferentes espécies do gênero *Lutzomyia* (BRASIL, 2017). O Brasil é o país que apresenta a maior prevalência de registro de casos de leishmaniose nas Américas e as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste são apontadas como regiões endêmicas (SAMPAIO, *et al.*, 2009; MOTA; MIRANDA, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012). Em Pernambuco, já foram relatados casos em todas as regiões, principalmente na Zona da Mata, que é responsável por 60% dos casos onde a maioria corresponde à forma cutânea localizada (BRANDÃO-FILHO *et al.* 1999; LAINSON; SHAW, 2005; NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

As formas clínicas da LTA apresentam um amplo quadro, dependendo de características imunes do hospedeiro, do vetor e das espécies de *Leishmania* (CHOI; KROPF P, 2009; PANIZ-MONDOLFI *et al.*, 2013). As infecções variam desde lesões cutâneas localizadas até lesões mais graves, acometendo a região das mucosas, conhecida como leishmaniose mucocutânea (GOLLOB *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2006). Uma das maiores complicações em uma infecção por *Leishmania* spp. é a capacidade do parasita em desviar e subverter as respostas imunes do hospedeiro, assim ele persiste no organismo e estabelece infecções crônicas (GURUNG; KANNEGANTI, 2015).

Já foi observado que o mecanismo protetor da LTA é dependente de células T, onde há uma diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção relacionada com o nível de expansão de células T CD4+ do tipo TH1 ou TH2 (BACELLAR *et al.*, 2002; DE LUCA; MACEDO, 2016). Os linfócitos que apresentam o perfil TH1 estão relacionados com a eliminação do parasita e tem diferenciação estimulada por citocinas como IL-12, TNF e IFN- γ . Enquanto as células de perfil TH2 são relacionadas com a susceptibilidade e multiplicação parasitária, caracterizadas pela secreção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (REIS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2013).

Diversos estudos têm se concentrado na análise do papel das células B como células apresentadoras de antígeno (APCs) capazes de ativar células T *virgens*, relacionadas com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, como também, promovendo a lise dos parasitos em sinergia com o sistema complemento (LIEW, 1990; TRUJILLO *et al.*, 2000; PEDRAS *et al.*, 2003; FAGUNDES-SILVA *et al.*, 2012). Assim, a análise de anticorpos anti-*Leishmania* permite avaliar o curso evolutivo da infecção e fornecer dados sobre as características da resposta imune. Diversos perfis e níveis de imunoglobulinas específicas para *Leishmania* têm sido detectados em pacientes com LTA em todas as manifestações clínicas e a intensidade dessa resposta está relacionada com a carga parasitária, cronicidade da infecção, espécie do parasito e a fatores intrínsecos do próprio hospedeiro (TRUJILLO *et al.*, 2000; REIS, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; ROMERO GA *et al.*, 2005). Pesquisas já correlacionaram as diversas manifestações clínicas da LTA com as diferentes subclasses de IgG. Nas leishmanioses cutânea e mucocutânea a resposta do tipo Th1 tem sido associada com a presença de isótipos IgG1, IgG2 e IgG3. Já a resposta do tipo Th2 está atrelada com a presença de IgG4 para a leishmaniose cutânea difusa (SOUZA *et al.*, 2005; RODRIGUEZ *et al.*, 1996).

Há uma problemática acerca do diagnóstico para LTA, onde o resultado final é adquirido através de uma associação de características clínicas, testes laboratoriais e dados epidemiológicos (KAR, 1995; BRITO *et al.*, 2000; 2008; TAVARES *et al.*, 2003). Em relação aos testes sorológicos para o diagnóstico da LTA, as técnicas mais utilizadas são a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Porém, esses métodos possuem algumas limitações considerando sua baixa sensibilidade e especificidade (Kar, K., 1995; DE PAIVA-CAVALCANTI, 2015). Um dos principais fatores para esse menor desempenho é a falta de correlação entre os níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença (KAR, 1995; VEXENAT *et al.*, 1996), além da presença de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos como *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* (VEXENAT *et al.*, 1996).

Devido a essas limitações, abordagens imunológicas alternativas vêm sendo estudadas. Uma delas é a citometria de fluxo, técnica que permite a análise simultânea de diferentes características físicas de partículas individuais conforme o fluxo de fluido desloca-se através de um feixe de luz. Isso possibilita a detecção e análise quantitativa de anticorpos anti-*Leishmania* através da formação de um complexo antígeno-anticorpo, onde um anti-anticorpo conjugado a um fluorocromo resulta em uma reação que emite fluorescência, captada pelo

citômetro de fluxo (PEDRAL-SAMPAIO *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA et al., 2013). Esta técnica apresenta diversas vantagens para os imunoensaios, tais como possibilidade de quantificação do analito, volume reduzido de amostra, grande reproduzibilidade e sensibilidade, uma ampla faixa dinâmica e capacidade para multiplexagem (JANI *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2013; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015). Simultaneamente, estudos têm avaliado a diminuição dos níveis de anticorpos em pacientes de LTA após tratamento quimioterápico. Esse fato possibilitou o uso da citometria de fluxo para além de diagnosticar, estabelecer um critério de cura (BRITO et al., 2001; DE OLIVEIRA, et al., 2013; PEREIRA et al., 2012).

Considerando as vantagens do uso da citometria de fluxo descritas por diversos trabalhos e observando que a utilização dos isótipos pode contribuir com uma maior precisão nos testes (MARTINS-FILHO et al., 1995; JANI *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2013; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015; KEENEY; HEDLEY; CHIN-YEE, 2017), pode-se observar que a aplicação da citometria de fluxo na detecção da LTA em pacientes antes e após tratamento, pode contribuir para a obtenção de um método de maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico e no critério de cura laboratorial.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

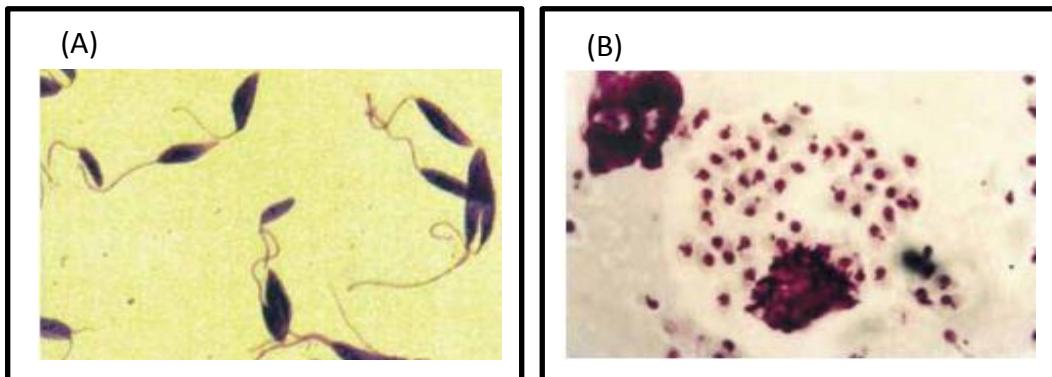
2.1. Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, que representa um grande problema de saúde pública. Ela é endêmica em 98 países e distribuída em quatro continentes: Ásia, África, Europa e América, apresentando uma média de 1,3 milhões de casos anuais (BRASIL, 2017). Em 2017, dos 22.145 novos casos reportados para a Organização Mundial de Saúde (OMS), 94% foram procedentes de sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017). É considerada uma doença negligenciada pois acomete, em sua maioria, indivíduos com um menor *status* socioeconômico. A OMS classifica a LTA como uma das seis doenças infecto-parasitárias mais importantes devido à sua magnitude e alta morbidade (DESJEUX, 2002).

No Brasil, a LTA apresenta a maior prevalência em notificações nas Américas com casos confirmados em todos os estados, sendo as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste consideradas endêmicas (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994; TIUMAN *et al.*, 2011; NEGRÃO; FERREIRA, 2014). Cerca de 39% das notificações realizadas no país estão concentradas na região Nordeste (VASCONCELOS, 2017). Em Pernambuco, a LTA tem incidência em todo o estado, porém com uma média de 60% dos casos na Zona da Mata (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2009). Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), em Pernambuco, no período de 2010 a 2017, a LTA apresentou 2.817 casos confirmados.

As leishmanioses são causadas por diversas espécies do parasito intracelular *Leishmania*, pertencentes ao reino Protista, filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, e pertencentes a dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (SINGH *et al* 2006). Esses parasitos apresentam duas formas evolutivas durante o seu ciclo de vida, a forma promastigota, de morfologia alongada e com presença de um flagelo livre (Figura 1A), encontrada no tubo digestivo do inseto vetor; e a forma amastigota, de morfologia arredondada sem a presença de flagelo aparente (Figura 1B), podendo ser observada em tecidos de hospedeiros vertebrados (VEGA-LÓPEZ, 2003; BASANO, 2004).

Figura 1 – Formas evolutivas do parasito *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado BRASIL, 2017.

Nota: Caracterização das formas evolutivas de *Leishmania* spp. (A) apresenta a forma promastigota em meio extracelular e (B) apresenta a forma amastigota do parasito no interior de macrófagos.

Até o momento, já foram descritas doze espécies de *Leishmania* causadoras da LTA humana nas Américas e oito espécies causadoras da doença em animais. No Brasil, existem sete principais espécies identificadas, sendo seis delas pertencentes ao subgênero *Viannia*. As espécies desse subgênero são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, como também as mais recentemente identificadas nas regiões Norte e Nordeste, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*. E apenas uma espécie do subgênero *Leishmania*, *L.(L.) amazonensis* (BRASIL, 2017). A espécie *L (V.) braziliensis* é considerada o agente específico da LTA no Brasil, devido ao grande número de casos associados a essa espécie encontrados em todo o território nacional (CROFT; COOMS, 2003; TIUMAN et al., 2011). Em Pernambuco, essa espécie também foi considerada a principal espécie circulante, através de análises das amostras isoladas de pacientes provenientes das áreas endêmicas do estado (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010).

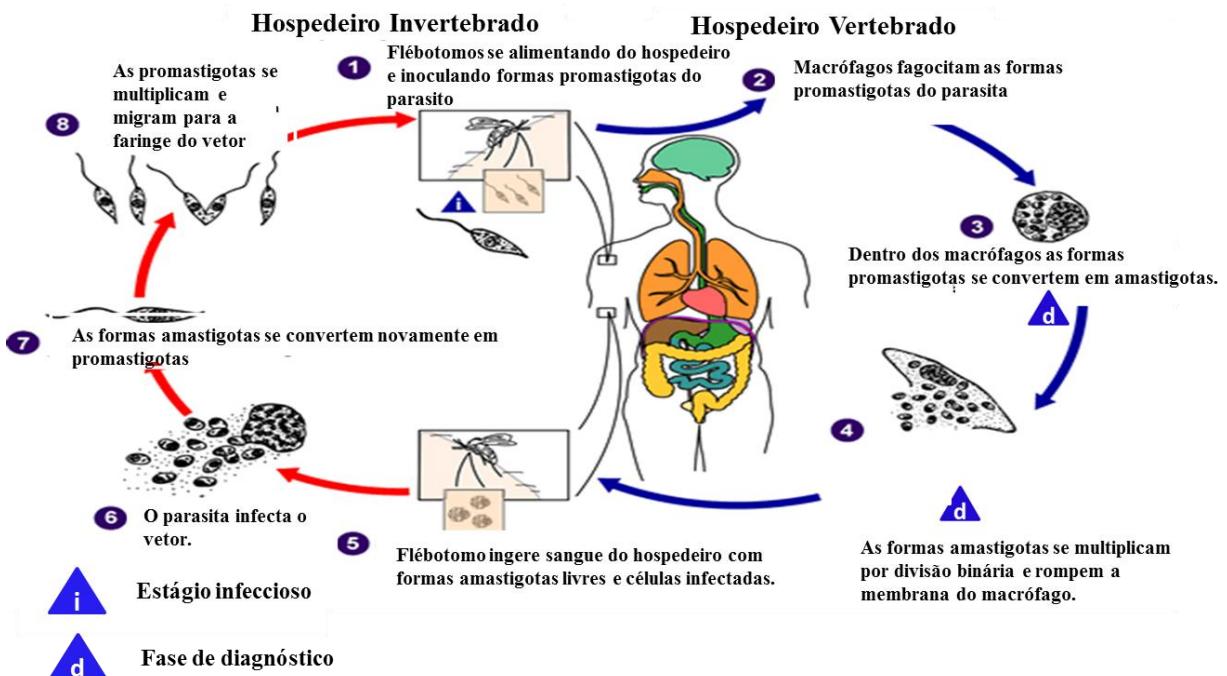
Essa doença é transmitida pelas fêmeas dos insetos vetores, os flebotomíneos. Eles pertencem à ordem Diptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). Esses insetos, dependendo da localização geográfica, são denominados também como birigui, mosquito-palha, entre outros (BRASIL, 2017). Nos vetores, o parasito é encontrado na forma promastigota na luz do trato digestivo, e é inoculado através da picada, junto à saliva, na pele dos mamíferos hospedeiros (DESJEUX 1996; PALATNIK-DE-SOUZA et al. 2001).

Nas Américas, o gênero associado à transmissão da LTA é o *Lutzomyia*, com cerca de 350 espécies distribuídas desde o Canadá até a Argentina. No Brasil, podem-se destacar as espécies: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia*

intermedia, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia migonei* (AZEVEDO *et al.*, 1996; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; BRASIL, 2017). A transmissão vetorial é a principal forma conhecida de transmissão para as Leishmanioses. Entretanto, existem casos mais raros de transmissão congênita, sexual e exposições ocupacionais (SIVAKUMAR R, 2004; BRITO, M. E. F., *et al.* 2012). Na literatura, já foram relatados onze casos de transmissão através de transfusão sanguínea, onde dez foram relatos de casos individuais na Ásia e Europa. Houve também um estudo de 32 casos no Brasil, relatando a transmissão entre pacientes submetidos à hemodiálise (KOSTMAN R, *et al.*, 1963; LUZ KG, *et al.*, 1997).

O ciclo de vida do parasito *Leishmania* (Figura 2) se inicia como inseto vetor infectado. Por apresentar hábito de hematofagia, ele se alimenta de hospedeiros vertebrados e acabam por inocular sua saliva contendo as formas promastigotas na corrente sanguínea. No hospedeiro infectado, essas formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema imune do hospedeiro, a exemplo dos macrófagos. No interior dessas células, o parasito sofre modificações morfológicas e se converte para a forma amastigota. Os parasitos então se multiplicam até eventualmente romperem a membrana celular e serem liberados na corrente sanguínea, podendo infectar novas células. Nesse momento, um inseto vetor não infectado ao se alimentar do hospedeiro vertebrado infectado, ingere formas amastigotas e células infectadas com o parasito e os mesmos seguem até a luz do seu trato gastrointestinal e se convertem novamente em formas promastigotas. Essas sofrem inúmeras divisões binárias e migram para a faringe e esôfago do vetor e se tornam infectantes. O ciclo se reinicia, quando novamente o vetor infectado ao se alimentar do hospedeiro inocula o parasito (DESJEUX, 2004; NEVES *et al.*, 2009; REITHINGER *et al.*, 2007; BRASIL, 2017).

Figura 2 – Ciclo de vida da *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado <https://www.cdc.gov/dpdx/>. 2014

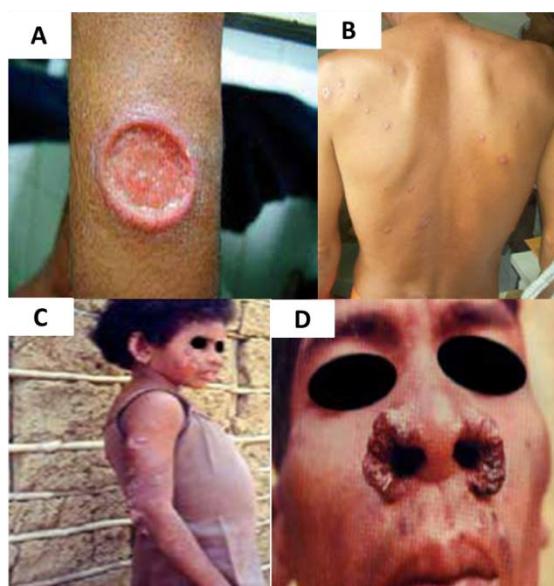
Nota: Desenho esquemático do ciclo de vida do parasita *Leishmania* spp.

2.2. Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA apresenta uma série de manifestações clínicas, que podem variar dependendo de diferentes fatores. Fatores esses comumente relacionados com a espécie do parasita envolvido na infecção, o inseto vetor, e também, aqueles ligados ao hospedeiro, como o status do sistema imunológico, estado nutricional e fatores genéticos (REITHINGER *et al.*, 2007; CASTELLANO *et al.*, 2009; WHO, 2010). Embora se considere que, para cada indivíduo acometido, a forma clínica da LTA esteja fortemente ligada a uma espécie do parasito, nenhuma espécie é exclusiva à apenas uma manifestação clínica (AMEEN, 2010).

Essa infecção pode se apresentar de duas principais formas: a Leishmaniose Cutânea (LC) e a Leishmaniose Mucocutânea (LM), e dentro delas, clinicamente, podem-se observar diferentes situações (Figura 3) (BRASIL, 2017; AMEEN, 2010). Assim como, casos de infecções assintomáticas também podem ocorrer. Esse último grupo é composto por indivíduos que foram expostos ao parasito, através do vetor, porém não desenvolveram lesões, podendo ser identificados através da sorologia positiva ao agente infeccioso (DESJEUX, 2004; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Figura 3 – Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana



Fonte: Adaptado BRASIL,2017.

Nota: Manifestações clínicas da LTA. A- Forma de Leishmaniose Cutânea; B- Forma da Leishmaniose Cutânea Disseminada; C- Forma da Leishmaniose Cutânea Difusa; D- Forma da Leishmaniose Mucocutânea.

Na LC, as lesões podem se apresentar de forma localizada, difusa ou disseminada. A forma localizada (Figura 3a) é considerada a manifestação mais frequente da doença. Caracteriza-se pela presença de uma única lesão, ou de no máximo 20 lesões (BRASIL, 2017). Ocorrem geralmente, próximo ao possível local onde o vetor inoculou os parasitas, sendo essas, áreas mais possivelmente expostas do corpo, como face e membros. Essas lesões apresentam atributos bastante peculiares, com uma forma arredondada, bordas elevadas, fundo avermelhado e granuloso, e indolor. Em casos de infecções secundárias com bactérias, pode haver produção de exsudato soropurulento e o indivíduo pode sentir dor. Esse tipo de lesão, de uma maneira geral, apresenta boas respostas ao tratamento e pode evoluir para a cura espontânea, porém, caso não ocorra uma boa resposta, podem permanecer por alguns anos (MARZOCHI; MARZOCHI, 1992; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; REITHINGER et al., 2007). Todas as espécies de *Leishmania* consideradas dermotrópicas são capazes de desencadear a LC, todavia, no Brasil, o principal agente etiológico é a *L. (V.) braziliensis*. Além disso, tem-se relatado casos onde ela pode evoluir para um quadro de LM (GOTO; LINDOSO, 2010; MANSUETO et al., 2014).

A forma disseminada (Figura 3b), não é considerada comum, representando cerca de apenas 2% dos casos notificados (BRASIL, 2017). Ela se caracteriza por apresentar numerosas lesões nodulares ou ulceradas, distribuídas por todos os segmentos do corpo do

indivíduo acometido, sem uma possível relação com o local de inoculação do parasito através do vetor. Essa forma tem sido associada às espécies, *L.(V.) braziliensis*; *L.(L.) amazonensis*; *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*, como principais agentes causadores dessa forma da infecção. Entretanto, a *L.(V.) braziliensis* é associada com um maior número de casos (BRASIL 2017; REITHINGER *et al.*, 2007; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

A forma difusa (Figura 3c) é considerada grave e rara, com presença progressiva de múltiplos nódulos e placas cutâneas, geralmente não ulceradas, distribuídas por todo o corpo sem relação com o possível local de picada do vetor. No Brasil, a espécie relacionada com o desenvolvimento dessa forma é a *L.(L.) amazonensis*. Até o momento, os casos não apresentam respostas eficientes através da terapia convencional (BARRAL *et al.* 1995; AMEEN, 2010; MANSUETO *et al.*, 2014).

A forma mucocutânea (Figura 3d) é uma forma grave que geralmente provém da cronicidade da forma cutânea em casos onde o tratamento não atingiu resultados eficientes, como também, de casos de cura espontânea sem intervenção de tratamento. Assim, decorre o desenvolvimento de lesões secundárias destrutivas nas cavidades oronasal, na faringe e laringe, devido a uma resposta imunológica acentuada. Essa infecção também pode atingir a área ocular e a mucosa presente em órgãos genitais. No Brasil, a espécie relacionada com um maior número de casos de LM é a *L. (V.) braziliensis*; entretanto, já houve casos na literatura atribuídos à *L. (L.) amazonensis* e à *L. (V.) guyanensis* (NEVES *et al.*, 2009; AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010; MANSUETO *et al.*, 2014).

2.3. Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana

Uma grande parcela das informações obtidas até os dias atuais sobre os mecanismos que o sistema imunológico utiliza para combater o parasito *Leishmania* spp. provêm de estudos com modelos animais. Os modelos mais utilizados são camundongos das linhagens C57BL/6 e C3H, esses considerados resistentes, e BALB/c, considerados susceptíveis, ambos expostos a infecção com *L. major* (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). Porém, não é sempre que os dados adquiridos nesses estudos corroboram com os dados adquiridos em ensaios laboratoriais *in vitro*. Devido a fatores como variação genética entre humanos e o modelo animal, a via de inoculação utilizada nas condições experimentais, geralmente subcutânea ou intravenosa, não se equivale à situação que ocorre no ciclo natural onde há uma grande quantidade de parasitas sendo inoculados pelo vetor, além da presença de sua saliva, que tem um papel importante na ativação do sistema imune (MOUGNEAU; 2011; OLIVEIRA *et al.*,

2014). Dessa forma, estudos laboratoriais *in vitro* também são realizados buscando avaliar a interação parasita-hospedeiro (ROGERS *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Já foi demonstrada a importância do papel das células da imunidade inata no curso da infecção, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DC) (MOUGNEAU; E, 2011). Neutrófilos são rapidamente recrutados ao sítio de infecção, e dependendo da espécie do parasita, eles podem agir eliminando-o, ou mesmo, serem infectados e considerados como “Cavalos de Tróia” (PETERS, N. C. *et al.*, 2008; SANTOS, S. C; BRODSKYN, C.I, 2014). Alguns trabalhos já relataram o papel positivo dos neutrófilos contra infecção de *L. major* e *L. braziliensis*, interagindo com macrófagos infectados e ativando os seus mecanismos efetores contra o parasito (NOVAIS, F. O *et al.*, 2009; DE SOUZA CARMO, 2010).

O papel das células NK, em sinergia com outras células fagocíticas, representa a primeira linha de defesa com a produção de citocinas TNF e IFN- γ . As DC tem um papel crucial para ativação das respostas específicas contra *Leishmania* spp. através da apresentação de抗ígenos nos linfonodos para os linfócitos T virgens, como também são as fontes principais de secreção da citocina IL-12 (VON STEBUT, E, *et al.*, 1998; SOUSA *et al.*, 2013).

O sistema complemento também atua na infecção, desempenhando um papel pró-inflamatório e apresenta como via de ativação as vias clássica e alternativa (MOUGNEAU; E, 2011). Os macrófagos são células frequentes no local da infecção. Essas células apresentam um papel crucial, pois podem estar envolvidas na multiplicação do parasito, servindo como células hospedeiras. Elas atuam na apresentação de抗ígenos para os linfócitos TCD4+ e TCD8 e atuam como células secretoras de citocinas modulando a diferenciação dos perfis dos linfócitos TCD4+. O seu mecanismo efetor é ativado através do contato direto com o parasita e por citocinas, como o IFN- γ , produzido por células TCD4+ do perfil TH1 (ZER *et al.*, 2001). Quando ativadas, essas células passam a sintetizar intermediários de nitrogênio e oxigênio reativo, que levam à destruição parasitária dentro da célula (NOVAIS, F. O *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2007).

Estudos em camundongos e humanos, como também, para todas as formas da Leishmaniose, observaram que a resposta imune protetora para a infecção é primordialmente mediada por células T com expansão de células CD4+, havendo uma diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção diretamente relacionada com o desenvolvimento de um perfil TH1 ou TH2 (BACELLAR *et al.*, 2002; DE LUCA; MACEDO, 2016). Os linfócitos T CD4+, que apresentam o perfil TH1, relacionado com a eliminação do parasita e ativação das respostas imunológicas do tipo celular, tem sua diferenciação estimulada por

citocinas como IL-12, TNF e IFN- γ , e expressam fator de transcrição *t-bet*. Enquanto as células de perfil TH2, relacionado com susceptibilidade e multiplicação parasitária, são caracterizadas por secreção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, e expressam fator de transcrição *GATA-3* (REIS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2013). Ainda há a estimulação de outro subtipo das células TCD4+, as Treg. As células Treg se diferenciam a partir de células T virgens, através da presença de citocinas como a IL-10 e o TGF- β e expressam o fator de transcrição *forkhead box P3* (Foxp3+). Essas células migram e se acumulam no local da infecção, onde atuam na regulação da ação de células efetoras locais (CAMPANELLI, ROSELINO, CAVASSANI K *et al.*, 2006; SAKAGUCHI *et al.*, 2008; NYLÉN, EIDSMO, 2012; DA SILVA SANTOS, BRODSKYN, 2014).

Diversos estudos têm se concentrado na análise da resposta imune humoral na LTA (TRUJILLO *et al.*, 2000; PEDRAS *et al.*, 2003; FAGUNDES-SILVA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015). As células B são competentes células apresentadoras de antígeno (APCs) capazes de ativar células T virgens. Essas células também se mostram relacionadas com o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias na infecção por espécies de *Leishmania* do subgênero (*Viannia*), como IFN- γ , TNF, IL-13 e IL-6 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes. Além disso, estudos *in vitro* tem demonstrado a ação de anticorpos anti-*Leishmania* promovendo a lise de formas promastigotas do parasito, em sinergia com o sistema complemento, facilitando o processo de fagocitose por células (LIEW, 1990) e salientando o uso dos linfócitos B como estratégia terapêutica para LTA (RODRIGUEZ-PINTO; SARAVIA; MCMAHON-PRATT, 2014).

Já foi possível observar uma influência do padrão de citocinas para a proliferação e diferenciação das células B produtoras de imunoglobulinas (SOUZA *et al.*, 2005; THOMAS; BUXBAUM, 2008; DE ASSIS SOUZA *et al.*, 2013). A intensidade observada na resposta humoral se mostra relacionada com a carga parasitária e com a cronicidade da infecção. Estudos mostram altos títulos de todos isotipos específicos anti-*Leishmania*, exceto IgD, nas diversas manifestações clínicas da LTA (TRUJILLO *et al.*, 1999). As subpopulações de linfócitos TH1 e TH2 induzem a síntese de diferentes isotipos devido aos seus diferentes perfis de secreção de citocinas. É descrito que citocinas do perfil TH1, como IFN- γ induzem a produção do isotipo IgG1 (OZBILGE *et al.*, 2006). Mas, quando associadas à citocina IL-6, induzem a produção do isotipo IgG2 e acabam por antagonizar a secreção de IgG1 por linfócitos B (KAWANO; NOMA; YATA, 1994). As citocinas de perfil TH2, como IL-4 e IL-5, estão associadas com a indução de IgG3, IgG4, IgE e IgA em humanos. (GASCAN *et al.*,

1991; NAKAMURA; KITANI; STROBER, 1993). Onde a IL-4 é a principal indutora de IgG3, IgG4 e IgE , e a inibição dessas está relacionada ao IFN- γ (PROBST P *et al.*, 1997; THOMAS; BUXBAUM, 2008). Nas leishmanioses cutânea e mucocutânea, tem se observado a predominância de isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 associados com um perfil de resposta TH1.

Na leishmaniose cutânea difusa, já foi observado a predominância do isotipo IgG4, associado a um perfil de resposta Th2 (RODRIGUEZ *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 2005). Altos níveis de IgE são observados em pacientes com um maior tempo de evolução da infecção, e para pacientes da forma mucocutânea, podem ser observados altos níveis de IgA (O'NEIL *et al.*, 1993).

2.4. Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

O diagnóstico da LTA é geralmente realizado com base em uma associação de características clínicas, dados epidemiológicos e testes laboratoriais (NEVES, 2002; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Porém, há uma grande dificuldade atrelada ao aspecto clínico devido ao fato de que essa doença pode se apresentar sob diferentes formas. Sendo assim, muitas vezes as lesões podem ser confundidas com outras doenças como: tuberculose cutânea, hanseníase virchowiana, infecções micóticas, úlcera tropical, sífilis, neoplasmas, e até mesmo alguns tipos de carcinomas e linfomas (NEVES, 2002; GONTIJO; CARVALHO, 2003; PISSINATE *et al.*, 2008; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015).

Desse modo, os métodos laboratoriais são fundamentais para determinar um diagnóstico diferencial da doença (NEVES, 2002; BRASIL, 2017). Um grande número de técnicas capazes de pesquisar diretamente o parasita, seu material genético, ou de identificar anticorpos do paciente e com precisão variável já foi descritos na literatura (GOTO, 2010). No fim, a escolha do método utilizado acaba sendo principalmente por infraestrutura e recursos disponíveis, ao invés de escolher o teste com maior precisão no resultado (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; KOBETS; GREKOV; LIPODOLVÁ, 2012).

2.4.1. Testes Parasitológicos

Os testes parasitológicos consistem na visualização de formas amastigotas do parasita, sendo assim, esses testes ainda são considerados o padrão-ouro por apresentarem uma alta especificidade (DE VRIES; 2015). Os testes são realizados a partir de amostras das lesões, obtidas através de biópsias e escarificações da pele. Dentro dessa abordagem os testes mais

utilizados são: pesquisa direta; isolamento em cultura e inoculação em animais (MACHADO, 2004; GOTO; LINDOSO, 2010; PAIVA-CAVALCANTI, 2015).

A técnica de pesquisa direta consiste na identificação de formas amastigotas de *Leishmania* em lâminas a partir de material obtido da lesão por escarificação ou punção aspirativa. Como também, podem ser realizadas através de lâminas preparadas pela impressão por aposição do fragmento do tecido obtido por biópsia, ambas as formas utilizando um microscópio óptico de luz, após a coloração por Giemsa (GENARO; NEVES, 1998). A sensibilidade do método varia de 50% a 70% e depende do número de parasitos presentes na lâmina que foi preparada (GOTO; LINDOSO, 2010). Há uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de parasitos na lesão e o tempo de infecção, dessa forma a positividade do teste também varia em relação ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após um ano. Embora seja uma técnica simples, rápida e de baixo custo, não é capaz de detectar parasitos em todos os pacientes (VEGA-LÓPEZ, 2003; BENSOUSSAN, 2006).

A técnica de isolamento do parasito para cultura *in vitro* é realizada utilizando meios de cultura apropriados, como, meio bifásico Novy e Mcneal modificado por Nicolle-NNN (NOVY, MCNEAL, 1903), LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (CAMAROO, 1964) e Schneider's suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (BRASIL, 2017). Para o teste, se utiliza amostras obtidas a partir de punção aspirativa ou biópsia das lesões cutâneas (REITHINGER *et al.*, 2007). A sensibilidade do teste varia de 15% a 84%, segundo o que já foi descrito na literatura (CUBA-CUBA *et al.*, 1984; MENGISTU *et al.*, 1992; ROMERO *et al.*, 2001; FABER *et al.*, 2003).

Fatores como o tempo de evolução da lesão, a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, o uso de drogas anti-*Leishmania*, como também, a técnica de coleta utilizada, podem interferir na sensibilidade do método (CUBA-CUBA *et al.*, 1984). A técnica de inoculação em animais para cultura *in vivo* utiliza principalmente, como modelo de estudo, o hamster (*Mesocricetus auratus*). Esse procedimento é geralmente realizado através da inoculação do parasito por via intradérmica no focinho ou nas patas superiores do animal. Porém é um método que apresenta algumas limitações, principalmente associada com a sensibilidade baixa e variável, entre 38% a 52%. Além do fato de se tratar de um método que necessita de um período maior até a formação das lesões, com a necessidade de um maior período de realização para acompanhamento do animal, altos custos e com pouco valor

prático para a rotina laboratorial (RODRIGUES, 2000; GOTO, LINDOSO, 2010; BRASIL, 2017).

2.4.2. Testes Moleculares

Diversos testes de diagnóstico baseados em abordagens de biologia molecular vêm sendo explorados ao longo dos anos com a ideia de tentar superar as limitações encontradas nos métodos implementados na rotina laboratorial. De uma forma geral, os testes se baseiam na identificação rápida do material genético do parasito e demonstram altos valores de sensibilidade, que podem variar de 91% a 98% (GOTO; LINDOSO, 2010; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; DE VRIE; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). O teste mais utilizado dentro dessa abordagem para o diagnóstico da LTA é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esse teste consiste na amplificação de segmentos específicos de DNA a partir de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) pareados especificamente nas margens da região alvo. Ele apresenta diversas vantagens por se tratar de uma técnica sofisticada e bastante versátil, onde são utilizadas pequenas quantidades de amostras. Porém, há uma problemática e o seu uso ainda é limitado devido à demanda por uma infraestrutura laboratorial adequada, mão de obra qualificada, embora esteja sendo cada vez mais encontrado em laboratórios de referência (SINGH, 1997; GOMES *et al.*, 1999; RODRIGUES, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2002; REITHINGER *et al.*, 2007; DE ASSIS SOUZA *et al.*, 2013).

2.4.3. Testes Imunológicos

Os testes imunológicos de diagnóstico para LTA são baseados na identificação da resposta imune celular e/ou humoral desenvolvida no organismo do indivíduo acometido pela infecção. Diferentes técnicas já foram desenvolvidas e implementadas como importantes ferramentas para o diagnóstico de infecções ocasionadas por *Leishmania* spp. Dentre essas técnicas, as mais utilizadas na rotina laboratorial são: a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Entretanto, os valores de sensibilidade e especificidade desses testes variam de acordo com a técnica escolhida e também com as diferentes manifestações clínicas (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; GOMES *et al.*, 2014; GOTO; LINDOSO, 2010; PAIVA CAVALCANTI *et al.*, 2015; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

A técnica de IFI é baseada na detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, através da formação de um imunocomplexo onde são empregados antígenos específicos. Geralmente se utilizam as formas promastigotas do parasito e anticorpos secundários conjugados a um corante fluorescente. É considerada relativamente sensível, e na literatura se relata valores de

71% para LC, 100% para LM e 96% para LV. Porém, apresenta baixa especificidade, ainda são observadas frequentes reações cruzadas com outras infecções ocasionadas por organismos também da família Trypanosomatidae, gerando falso-positivos para portadores de doenças como a Doença de Chagas e Leishmaniose Visceral (VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996; BRITO *et al.*, 2009).

A técnica de ELISA é uma ferramenta bastante valiosa para pesquisas científicas. Muitos trabalhos na literatura relatam que essa técnica apresenta maiores valores de sensibilidade em relação ao teste de IFI, porém esses resultados são diretamente relacionados ao tipo de antígeno utilizado no ensaio (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; GOMES *et al.*, 2014; GOTO; LINDOSO, 2010). No Brasil a IFI e o ELISA são os testes mais utilizados para o diagnóstico das leishmanioses. O resultado da IFI é normalmente expresso em diluições. Se aceita como positivas diluições a partir de 1:80. O teste de ELISA tem o seu resultado expresso em unidades de absorbância a um raio de luz, em uma reação com diluições fixas ou mais comumente, apenas como reagente ou não (BRASIL, 2017). De uma maneira geral, as principais limitações de ambos os testes de abordagem imunológica é a presença de reações cruzadas, sensibilidade e especificidade variáveis e a não correlação dos níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença, como demonstrado na Tabela 1 (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; GOMES *et al.*, 2014; GOTO; LINDOSO, 2010; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

Dessa forma, por todas as limitações encontradas para os principais métodos utilizados para o diagnóstico da LTA, muitos grupos de pesquisa vêm investindo em estudos para aperfeiçoar e desenvolver métodos alternativos para diagnosticar essa doença. Um exemplo de estudo, é o que vem sendo realizado com a Citometria de Fluxo (CF), tecnologia que permite a análise quantitativa de partículas em suspensão que se movem em um fluxo e são interceptadas por um feixe de luz (FALDYNA *et al.*, 2001; NAKAGE *et al.*, 2005).

As células da amostra em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos, permitindo a identificação e a quantificação das células através do tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência. Apresenta diferentes vantagens para os imunoensaios, tais como a possibilidade de quantificação do analito, volume reduzido de amostra, elevada reproduzibilidade e sensibilidade, uma ampla faixa dinâmica, e, sobretudo potencial para multiplexagem (JANI *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2013; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015). É uma tecnologia já utilizada para o diagnóstico de vários tipos de câncer como a leucemia (KEENEY; HEDLEY; CHIN-YEE, 2017). Como também, já foi descrito na literatura o uso da CF como técnica para o monitoramento da

eficácia terapêutica da Doença de Chagas (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995). Além disso, outros trabalhos como os de PEREIRA *et al.* (2012) e OLIVEIRA *et al.* (2013) demonstraram que através da citometria de fluxo (CF) é possível detectar anticorpos anti-*Leishmania* circulantes e monitorar a cura pós-tratamento da LTA, utilizando parasitos vivos e parasitos fixados.

Tabela 1: Vantagens e limitações dos testes imunológicos no diagnóstico das leishmanioses

MÉTODO	ANTÍGENO	VANTAGEM	LIMITAÇÃO
Ensaio Imunoenzimático	Proteínas Recombinantes	Baixo custo; sensibilidade e especificidade, relativamente altas	Sensibilidade e especificidade altamente dependente do antígeno usado; alta reação cruzada com outras doenças
Reação de Imunofluorescência	Parasitos mortos	Alta sensibilidade e especificidade	Processo laborioso; tempo e custo elevado; necessita de profissionais altamente capacitados
Citometria de Fluxo	Parasitos Mortos e proteínas recombinantes	Alta sensibilidade e especificidade; diferenciação entre infecção, doença e pacientes curados; baixa reação cruzada com outras doenças	Alto custo associado ao equipamento e reagentes; profissionais bem capacitados
Testes Rápidos (Imunocromatográfico)	Proteínas Recombinantes	Baixo custo; rapidez; pequena quantidade de sangue	Sensibilidade e especificidade altamente dependente do antígeno usado; alta reação cruzada com outras doenças

Fonte: Adaptado de De Paiva-Cavalcanti *et al.* (2015).

2.5. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana

O tratamento de primeira escolha para a LTA, independente da forma clínica apresentada pelo paciente acometido, é realizado através de antimoniais pentavalentes. Esses compostos existem sob duas principais formas, o antimoniato de meglumine/antimoniato de N-metilglucamine (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®), esse último não é comercializado no Brasil (DUQUE, *et al.*, 2016; BRASIL 2017). Essas drogas agem na via bioenergética das formas amastigotas do parasita, inibindo a glicólise e oxidação de ácidos graxos (GONTIJO; CARVALHO, 2003; EVAN;KEDZIERSKI, 2011).

A dose recomendada para o tratamento da doença no Brasil é de 15 mg/Kg/dia e de 20 mg/Kg/dia por vinte e trinta dias em média para LCL-LCD e para LM, respectivamente. A administração é realizada através de injeções intramusculares ou via endovenosa em ciclos de vinte a trinta dias (OMS, 2010; OLIVEIRA *et al* ,2011), porém, são dosagens que necessitam

de acompanhamento médico. Já foi descrito que em um regime de dosagem de 20 mg/Kg/dia a droga pode atingir seu limiar de toxicidade levando a efeitos colaterais que acabam por inviabilizar o uso da droga para o paciente (GOTO; LINDOSO, 2010).

O tratamento da LTA por antimoniais apresenta limitações, que por muitas vezes levam o paciente a desistir de dar continuidade ao tratamento. Essas limitações estão principalmente relacionadas à longa duração dos ciclos, às vias necessárias para administração, como também, aos diversos efeitos colaterais, como: mialgia, falta de apetite, vômitos, febre, dores de cabeça, insônias e toxicidade para o coração, fígado e sistema nervoso. Além disso, apesar do antimonial ser a principal droga no tratamento contra as Leishmanioses, não se sabe detalhadamente o seu mecanismo de ação (REIS, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007; ORYAN A, AKBARI M, 2016; AL-JAWABREH A, DUMAIDI K, EREQAT S, *et al.*, 2017).

As drogas para um tratamento secundário, nos casos onde não se obtêm boas respostas com os antimoniais, são a Anfotericina B e a Pentamidina (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BASANO, 2004; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; DIRO, E *et al.*; 2015). O uso dessas drogas é realizado sob acompanhamento médico (OMS 2002). A anfotericina é uma droga de alta toxicidade e baixa tolerância e apresenta um grande número de efeitos colaterais (SANDE & MANDELL, 1987; FALCI; PASQUALOTO, 2015). Já a Pentamidina é utilizada no tratamento da LC desde 1974 e também apresenta alguns efeitos adversos, porém já foi possível observar alguns casos com resultados satisfatórios para infecções associadas com a espécie *L. (V.) guyanensis* (ALKEMADE 1984; GADELHA *et al.* 1990; DIRO, E *et al.*, 2015).

Outras abordagens como o uso de antígenos recombinantes de *Leishmania* também têm sido testados como candidatos à imunoterapia. A associação entre antimoniais e imunomoduladores tem sido observada como um tratamento alternativo para pacientes refratários aos antimoniais. Embora esta modalidade de tratamento esteja crescendo, ainda são necessários ensaios clínicos para confirmar o benefício na rotina clínica (CROFT; COOMBS, 2003; AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010; NOVAIS; SCOTT, 2015; BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018). É possível ainda, observar casos de pacientes com cura sem a interferência de drogas. Sugere-se que esses pacientes desenvolvem uma resposta imune capaz de controlar a sua infecção por *Leishmania* (BRITO et al., 2001; AMEEN, 2010; TIUMAN et al., 2011; GURUNG; KANNEGANTI, 2015).

2.6. Critério de Cura da Leishmaniose Tegumentar Americana

O critério de cura existente, até os dias atuais é clínico, com cicatrização completa das lesões na pele. É recomendado que após a determinação da cura clínica, o paciente seja acompanhado clinicamente de dois em dois meses até completar um ano do término do tratamento (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2017).

Diversas abordagens vêm sendo estudadas na tentativa de implementar um método para acompanhamento do paciente após o tratamento quimioterápico e assim, determinar um critério de cura laboratorial para LTA. Testes parasitológicos já foram sugeridos como critério de cura, porém demonstram limitações. Principalmente devido à relação inversamente proporcional que existe entre a quantidade de parasitos e o tempo de evolução das lesões, uma redução no número observado de parasitos não traduz necessariamente uma resposta positiva ao tratamento (GUTIERREZ *et al.* 1991).

Pesquisas com bases imunológicas apontam a imunidade humoral como um indicador utilizado para o monitoramento do paciente até sua evolução para cura da doença. Testes como a IFI são utilizados para avaliar a reatividade de anticorpos anti-*Leishmania* e pode se observar uma redução nos níveis de anticorpos nos pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. Já foi sugerida uma relação entre a cura das lesões e o aparecimento de resultados negativos na IFI para esses pacientes (BITTENCOURT, 1968; AMATO, 1998; SCHUBACH *et al.*, 1998). Outros estudos utilizaram o teste de ELISA e realizaram uma avaliação quantitativa da persistência de anticorpos IgG ao longo do desenvolvimento da infecção para pacientes portadores de LTA (MENDONÇA *et al.*, 2004; ROMERO *et al.*, 2005). Esse tipo de estudo oferece diversas informações sobre a evolução clínica, epidemiológica e controle da LTA (MENDONÇA *et al.*, 2004).

A OMS ainda sugere que testes sorológicos sejam utilizados como um auxiliar para confirmar o critério de cura clínico, ainda que esses testes não estejam difundidos na prática devido a sua baixa eficácia na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (OMS, 1990). Entretanto, o uso de testes sorológicos para determinar critério de cura ainda é bastante discutido, devido ao fato que os testes de IFI e ELISA, que são os testes mais utilizados na rotina laboratorial para o diagnóstico, apresentam algumas limitações como: sensibilidade e especificidade variável, que pode ser atribuída à falta de uma preparação antigênica padrão, necessitam de uma escolha antigênica ideal; podem apresentar reações cruzadas com outros tripanossomatídeos e não correlacionam os níveis de anticorpos circulantes com o estágio da

doença (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; GOMES *et al.*, 2014; GOTO; LINDOSO, 2010; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

Com isso, diversas pesquisas tem buscado a implementação de um novo método sorológico que possa ser utilizado para confirmação do critério de cura, um exemplo é a citometria de fluxo. Diversos trabalhos como os de Oliveira *et al.* (2013) e Pereira *et al.* (2012) realizaram estudos utilizando a técnica de citometria de fluxo e conseguiram avaliar a aplicabilidade do teste para ser implementado como ferramenta diagnóstica, como também observaram que é um método cabível à determinação de um critério de cura pós-terapêutica de diferentes infecções, dentre elas a LTA.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar, através da citometria de fluxo, a participação da resposta imune humoral em indivíduos infectados com *L. (V.) braziliensis* antes e após tratamento quimioterápico com Glucantime®.

3.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar a aplicabilidade da citometria de fluxo em identificar pacientes com LTA ativa;
- Comparar o desempenho das técnicas de reação de imunofluorescência indireta, ELISA e citometria de fluxo na identificação de pacientes antes e 1, 2 e 5 anos após o tratamento;
- Padronizar o ensaio de citometria de fluxo para o diagnóstico da LTA utilizando os isotipos de IgG (IgG1, IgG2 e IgG3) anti-formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*;
- Avaliar a aplicabilidade dos isotipos de IgG (IgG1, IgG2 e IgG3) em identificar pacientes com doença ativa e os curados após tratamento quimioterápico;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Processo de seleção da população estudada

Em parceria com o Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), que através de um grupo realizou a busca ativa de pacientes procedentes diferentes municípios da Zona da Mata de Pernambuco, considerada área endêmica para LTA. Os pacientes foram atendidos por uma médica dermatologista do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) nos postos de saúde do município, onde ficaram cientes do objetivo do estudo e concordar em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE). Após assinar o termo, foram realizadas a anamnese com os pacientes e posteriormente as amostras foram coletadas. O material coletado foi repassado para o Serviço de Referência em Leishmanioses e processado no Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ (IAM), na cidade de Recife-PE. Em seguida foram cedidas em alíquotas para o Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, onde os experimentos foram realizados. Para o estudo, foram selecionados 51 pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 15 anos, portadores de lesões ativas. Devido ao fato de que o presente trabalho faz parte de um projeto maior, as coletas iniciaram há cerca de 10 anos e as amostras são conservadas no laboratório. Sendo assim, inclui-se no estudo amostras de 14 pacientes antes do tratamento, um ano, dois e cinco anos após o tratamento quimioterápico com Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina). O grupo controle foi constituído por 10 indivíduos saudáveis, residentes em área não endêmica, que também concordaram em assinar o TCLE. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAM/FIOCRUZ (CAAE 11083812.7.0000.5190).

4.2. Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes

Além da avaliação clínica e epidemiológica dos pacientes, realizada pela médica dermatologista, as amostras coletadas foram submetidas a alguns procedimentos laboratoriais para confirmação da doença. Os exames foram realizados em cooperação com o Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) e incluiram: pesquisa direta; punção aspirativa para inoculação em hamster; biópsia; imunofluorescência indireta (IFI) e reação em cadeia de polimerase (PCR).

4.3. Obtenção de soro

A partir do sangue coletado, o soro foi obtido após centrifugação a 400 X g por 5 minutos a temperatura ambiente. As amostras de soros foram inativadas a 56°C por 30

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

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

Inicialmente formas promastigotas da cepa de referência (MHOM/BR/75/M2903) mantidas *in vitro* foram expandidas em meio Schneider's até atingir a fase exponencial. Em seguida, os parasitos foram transferidos para tubos de polipropileno de 50 mL, e foram submetidos à baixa centrifugação (100 X g) a 25°C por 10 minutos. Em seguida, os parasitos foram recuperados do sobrenadante e lavados em salina tamponada contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), por três vezes, a 4°C, 871 X g durante 10 minutos. O sedimento formado foi homogeneizado cuidadosamente e ressuspenso em solução fixadora de Paraformaldeído a 1% e estocado por 24 horas a 4°C. Após a incubação, os parasitas foram lavados com salina tamponada contendo 3% de SFB, por duas vezes. Em seguida, a alíquota de parasitos da suspensão foi contada em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para os ensaios de citometria de fluxo.

4.5. Obtenção de Antígeno total de *Leishmania (Viannia) braziliensis* para Imunofluorescência Indireta e ELISA

Inicialmente formas promastigotas da cepa de referência (MHOM/BR/75/M2903) mantidas *in vitro* foram expandidas em meio Schneider's em garrafas de cultura média, obtendo aproximadamente 10^8 de parasitas. Em seguida, foram transferidos para tubos cônicos e centrifugados a 400 X g por 10 min. Após essa etapa, foram realizadas 3 lavagens com PBS 1x pH 7.2. O pellet formado foi ressuspenso com 750 μ L de tampão de lise branda e 250 μ L de inibidor de protease e depois repassado para um tubo eppendorf de 1,5mL. Para a lise das células, foram realizados sucessivos congelamentos e descongelamentos em nitrogênio líquido e banho-maria. Posteriormente, adicionou-se 20 μ L da solução em uma lâmina de microscopia para verificar a viabilidade das células. Caso ainda tenha sido observada a persistência de algum parasita, foram realizadas mais etapas de congelamento e descongelamento. A solução foi centrifugada por 10.000 X g a 4°C por 15 min e o sobrenadante constituído por抗ígenos solúveis foi coletado, e o pellet constituído por抗ígenos insolúveis, foram ressuspensos em PBS. A fração solúvel foi quantificada com reagente de Bradford (10 μ L da suspensão antigênica, 200 μ L de Bradford e 790 μ L de água milli-Q). Em seguida, a suspensão foi aliquotada em tubos menores e congelados a -80°C até o uso.

4.6. Reação de imunofluorescência indireta

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

4.7. Reação de ELISA

O ensaio de ELISA foi realizado com o protocolo desenvolvido *in house* no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do IAM. A placa foi sensibilizada com 100µL do antígeno a 5 µg/mL, previamente diluído em tampão Carbonato/Bicarbonato 0,06 M pH 9,6. A placa foi incubada a 4°C por 18 horas em câmara úmida. Após incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 0,015 M pH 7,2 contendo 0,05% de tween 20, onde na primeira lavagem desprezou-se o sobrenadante e nas seguintes a solução permaneceu em repouso por 10 minutos antes de ser desprezada. Os soros foram diluídos de 1/40 até 1/1280 em PBS 0,015 M pH 7,2 contendo 0,05% de tween 20 e leite em pó. Em cada placa, foi adicionado um padrão negativo com as mesmas diluições das amostras, para calcular os valores da média e desvio padrão. Foram adicionados 100 µL por poço das amostras de soro dos pacientes diluídos e a placa foi incubada por 1 h em câmara úmida a 37°C e posteriormente lavada. Novamente foram realizadas lavagens como descrito anteriormente. Foi realizada uma incubação de 1 hora com 100 µL de anti- IgG humana cadeia gama específica conjugada à peroxidase, no título ideal para o teste (Calbioquem, título de 1/2500). A placa foi lavada mais 3 vezes com PBS 0,015 M pH 7,2 contendo 0,05% de tween 20, como já descrito, e 100 µL por poço do cromógeno (ácido 5-amino salicílico ou OPD) foram adicionados. Após 1h de

incubação em câmara úmida à temperatura ambiente e na ausência de luz, a reação foi parada com 25 μ L por poço de NaOH 1M. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 450nm. Para interpretação dos resultados, o limiar de reatividade de cada soro positivo foi calculado levando-se em consideração a média aritmética das absorbâncias das diluições do controle negativo mais 2 vezes o desvio padrão. Assim, foram consideradas amostras positivas as que apresentaram títulos maiores que o resultado da relação descrita acima.

4.8. Ensaio de citometria de fluxo para pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*

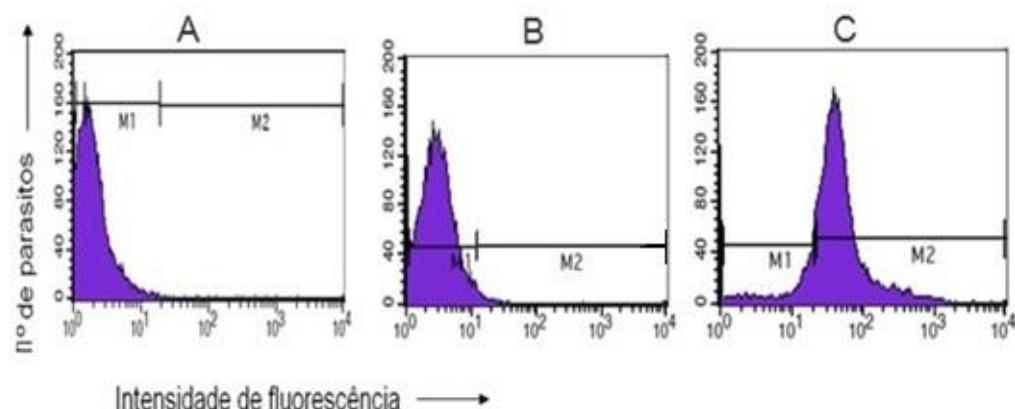
O ensaio de citometria de fluxo para a pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* foi realizado de acordo com Rocha *et al.* (2002) no equipamento FACS Calibur (Becton & Dickson) com aquisição de 20.000 eventos. Uma suspensão de parasitos ($2,5 \times 10^5$ /poço) foi incubada em placas de 96 poços de fundo em “U” a 37°C por 30 minutos na presença de diferentes diluições do soro (1:64 a 1:32.768). Após incubação com soros, os parasitos foram lavados duas vezes com 150 μ L de PBS-10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (1000 X g por 10 minutos, a 4°C). Em seguida, os parasitos foram incubados a 37°C por 30 minutos ao abrigo de luz, com 50uL dos isotipos IgG humana (IgG1, IgG2 e IgG3), depois a placa foi lavada duas vezes com PBS-10% de SBF. Posteriormente, a placa foi incubada, nas mesmas condições anteriores, com 10uL do fluorocromo estraptavidina-ficoeritrina (PE) (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) diluída a 1:100 em PBS-10% de SFB. Após a incubação com os anticorpos reveladores, os parasitas foram lavados e fixados com 200 uL de Paraformaldeído a 1%. As amostras foram mantidas por 30 minutos a 4°C, ao abrigo de luz, até o momento da leitura no citômetro de fluxo. As leituras das amostras no citômetro de fluxo foram realizadas num período máximo de 24 horas após a fixação dos parasitas.

4.8.1. Análise dos dados

Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitas após incubação com soros obtidos dos pacientes e soros controles foram expressos sob a forma de percentual de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) observados para cada teste individual em relação ao controle do conjugado. O PPFP foi determinado para cada amostra através do estabelecimento de um limiar de negatividade em função da curva de fluorescência obtida para o controle da ligação inespecífica do conjugado (Ligação do parasito, anticorpo e

fluorocromo). Para cada experimento foi estabelecido um limiar de reatividade de no máximo 2% de PPFP como o controle interno da reação (controle do conjugado). Em seguida, foi empregado o mesmo marcador e foram obtidos os valores de PPFP para amostras individuais. A Figura 4 mostra o histograma de PPFP sobre o qual os dados foram analisados.

Figura 4 - Histogramas da porcentagem de parasitas fluorescentes positivos.



Fonte: Histograma realizado pela autora no programa CellQuestPro®.

Nota: A: Controle interno da reação; B: Controle negativo; C: Amostra de paciente positivo. M1 corresponde à região negativa e M2 à região positiva no histograma.

4.9. Análises estatísticas

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

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da população de estudo e resultados laboratoriais

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

Tabela 2 - Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes.

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

Fonte: Elaborado pela autora.

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

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

Tabela 3 – Resultados dos exames laboratoriais dos pacientes.

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

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Exames laboratoriais realizados pelo Serviço de Referência em Leishmaniose –IAM. IDRM = Intradermorreação de Montenegro; PCR = Reação em cadeia de polimerase; + = positivo; - = negativo; NR= não realizado; S = sim; N =não.

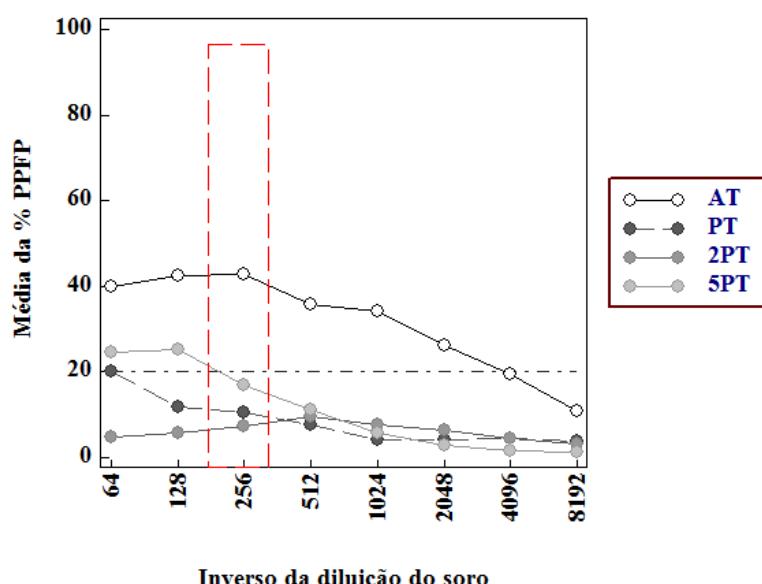
5.2. Citometria de Fluxo

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

5.2.1. Padronização do IgG total – Curvas de titulação

A reatividade do ensaio de Citometria de Fluxo foi expressa a partir da média dos valores de PPFP das amostras de soro, obtida após incubação das amostras nas diluições de 1:64 a 1:8192, com formas promastigotas fixadas do parasita. O ponto de corte foi calculado através da análise da curva ROC, sugerindo que o melhor ponto de corte a ser utilizado no teste seria de 20% de PPFP, como proposto por Martins-Filho em 1995. A análise da curva de titulação dos anticorpos IgG anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes, expressos como médias dos valores de PPFP, sugerem que a diluição 1:256 é a região (R) de reatividade que corresponde ao primeiro título de reação diferencial entre os indivíduos antes do tratamento (AT) e um, dois e cinco anos após tratamento (PT) (Figura 5).

Figura 5 - Curvas de titulação de anticorpos IgG anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes nos soros dos pacientes.



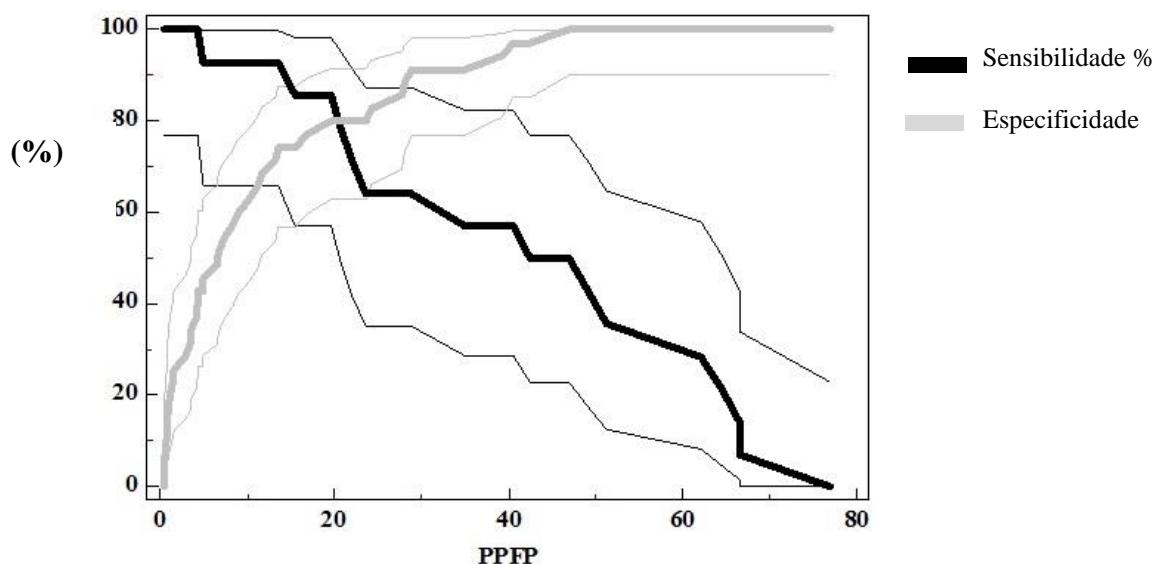
Fonte: Realizado pela autora através do software MedCalc Statistical.

Nota: Os pacientes foram classificados quanto à presença de lesão AT e ausência de lesão (1,2 e 5 anos PT). A linha tracejada corresponde ao ponto de corte de 20% de PPFP

5.2.2. Curva ROC - Avaliação do ponto de corte

Para calcular o ponto de corte ideal para o ensaio, foi realizada a construção da curva ROC. Assim, foram construídas curvas de sensibilidade e especificidade para diferentes valores de PPFP. A figura 6 apresenta os valores de sensibilidade e especificidade em função dos diferentes pontos de corte, onde 20% de PPFP é o que melhor se aplica ao teste.

Figura 6 - Curvas de sensibilidade e especificidade da citometria de fluxo



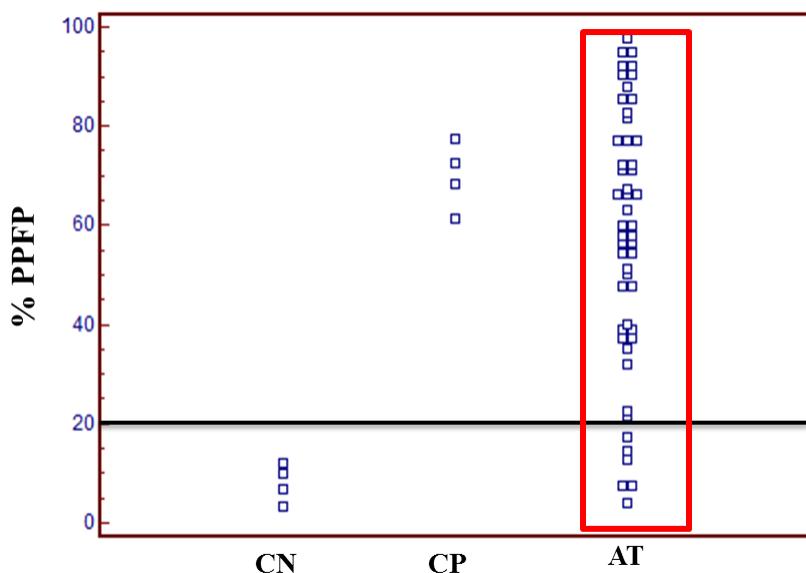
Fonte: Realizado pela autora utilizando o programa MedCalc Statistical.

Nota: Curvas de sensibilidade e especificidade em função de diferentes pontos de corte.

5.2.3. Aplicabilidade do isotipo IgG total em identificar pacientes com LTA ativa

Para avaliar a aplicabilidade do isotipo IgG em identificar pacientes positivos para LTA, foram utilizadas 51 amostras de soros de pacientes portadores de LTA antes do tratamento. Essas amostras foram incubadas com formas promastigotas fixadas do parasita. Para os ensaios, foi considerado um ponto de corte de 20% de PPFP, ou seja, aqueles pacientes que apresentassem um PPFP maior ou igual a 20% foram considerados positivos para LTA para o teste de CF. O teste conseguiu identificar como positivos 88,23% dos pacientes testados antes do tratamento (AT), como demonstrado na Figura 7.

Figura 7 - Avaliação da aplicabilidade do ensaio de citometria de fluxo utilizando o anticorpo IgG na identificação de pacientes com LTA ativa.



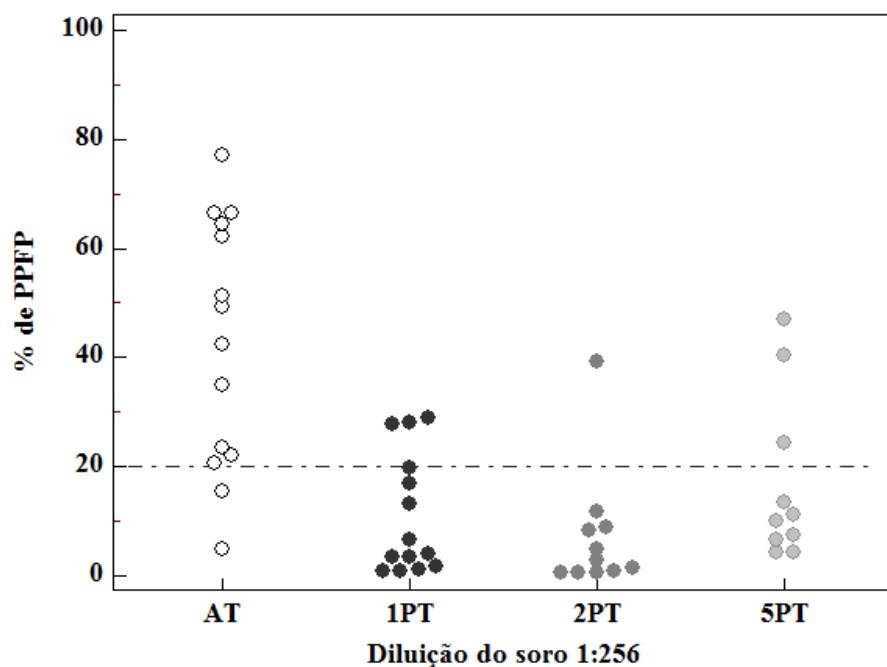
Fonte: Elaborado pela autora pelo programa MedCalc Statistical.

Nota: CN – Controle Negativo; CP – Controle Positivo; AT – 51 pacientes antes do tratamento; Linha preta – Ponto de corte de 20% de PPFP.

5.2.4. Aplicabilidade da Citometria de Fluxo em identificar pacientes antes e depois o tratamento

Para avaliação da aplicabilidade da Citometria de Fluxo em identificar pacientes portadores de LTA e os curados após o tratamento foram utilizados soros de 14 pacientes AT e os mesmos soros para um, dois e cinco anos após inicio do tratamento quimioterápico (Figura 8). Analisando a região de reatividade 1:256 para as amostras e empregando um ponto de corte de 20% de PPFP, foi demonstrado que a pesquisa é aplicável à identificação de casos de leishmaniose cutânea localizada uma vez que permitiu identificar 86% (12/14) dos indivíduos AT com valores situados numa região de alta reatividade, ou seja, positivos; e 77% (10/13), 80% (8/10) e 70% (7/10) dos indivíduos, respectivamente, um, dois e cinco anos PT com valores de PPFP restritos a uma região de baixa reatividade, ou seja, negativos para o ensaio de citometria de fluxo.

Figura 8 - Avaliação da aplicabilidade do ensaio de citometria de fluxo na identificação de pacientes após o tratamento



Fonte: Realizado pela autora através do programa MedCalc Statistical.

Nota: Ensaio realizado a partir dos soros de pacientes da região de reatividade com título diferencial entre AT e 1, 2 e 5 anos PT. A linha pontilhada corresponde ao ponto de corte de 20% de PPFP.

5.3. Imunofluorescência Indireta

Para avaliar o desempenho do teste de Imunofluorescência Indireta em identificar pacientes portadores de LTA e os curados após o tratamento, foram utilizadas as mesmas amostras do ensaio de Citometria de Fluxo. Do número total de pacientes, apenas aqueles que demonstraram títulos a partir de 1:20 foram considerados positivos. Dos soros avaliados, 92,85% (13/14) foram positivos antes do tratamento. Um ano após o tratamento com Glucantime®, 61,54% (8/13) foram identificados como positivos; dois anos após o tratamento 70% (7/10) foram positivos e cinco anos após o tratamento 50% (5/10) dos soros avaliados ainda continuaram positivos para o teste (Tabela 4).

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

Paciente	AT	1PT	2PT	5PT
1	-	20	20	20
2	80	40	40	-
3	80	20	20	20
4	20	-	-	40
5	80	40	40	NR
6	40	-	NR	-
7	80	-	-	-
8	80	20	NR	NR
9	80	20	20	20
10	80	-	-	-
11	40	-	NR	20
12	20	20	20	NR
13	40	NR	NR	NR
14	40	20	20	-
Positivos: 92,85% 61,54% 70% 50%				

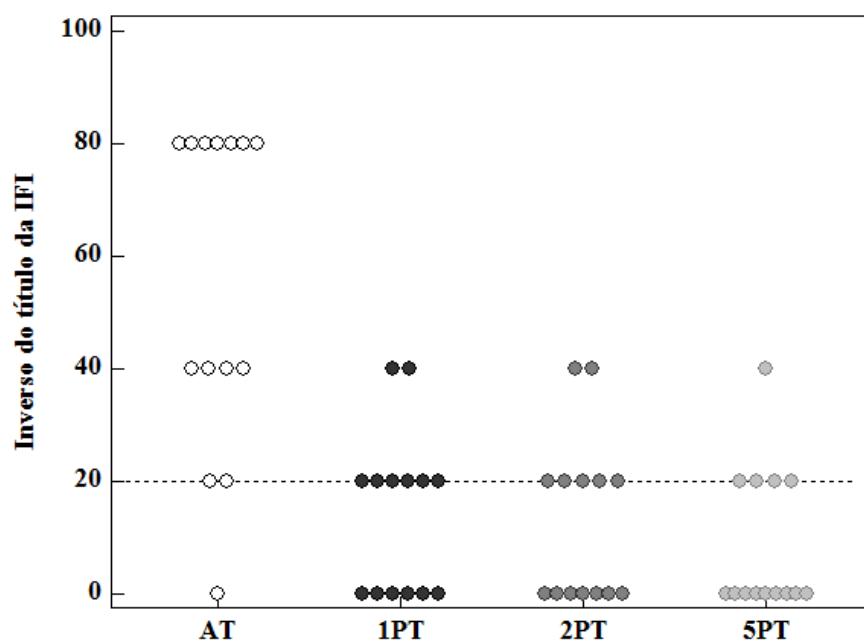
Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: IFI= imunofluorescência indireta; AT= antes do tratamento; PT= pós-tratamento; NR= não-realizado.

Valores expressos em inverso do título de diluição

Em relação à análise da aplicabilidade deste método em identificar LTA ativa, foi construído um gráfico (Figura 9), a partir do programa estatístico MedCalc e utilizando os valores do inverso do título da diluição em que os pacientes foram positivos para o teste descritos na Tabela 4. Como forma de obter uma melhor visualização dos dados obtidos para a avaliação da reatividade de IgG total dos soros dos pacientes antes e um, dois e cinco anos após o tratamento para o teste de IFI.

Figura 9 - Resultados da IFI para avaliar a reatividade de IgG em soros de pacientes antes e após tratamento.



Fonte: Realizado pela autora através do software MedCalc Statistical.

Nota: Pacientes AT (antes do tratamento) e 1PT, 2PT e 5PT (após o tratamento) submetidos ao método de imunofluorescência indireta. A linha pontilhada corresponde ao ponto de corte de 20%.

5.4. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Para avaliar o desempenho do teste de ELISA em identificar pacientes portadores de LTA e os curados após o tratamento, foram utilizadas as amostras de soros dos pacientes utilizados para os ensaios de Citometria de Fluxo e de Imunofluorescência Indireta. Em cada placa, foram realizadas diluições seriadas, compreendendo cinco diluições: de 1:40 a 1:1280. E aqueles que apresentaram títulos de soro a partir da diluição 1:40, foram considerados positivos para o teste. Dos soros avaliados, 92,8% (13/14) dos pacientes antes do tratamento com Glucantime® foram positivos; 53,8% (7/13) dos pacientes após um ano de tratamento foram positivos; 88,8% (8/9) dos pacientes dois anos após tratamento foram positivos e 100% dos pacientes cinco anos após tratamento (5/5) continuaram com título positivo para LTA (Tabela 5).

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

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

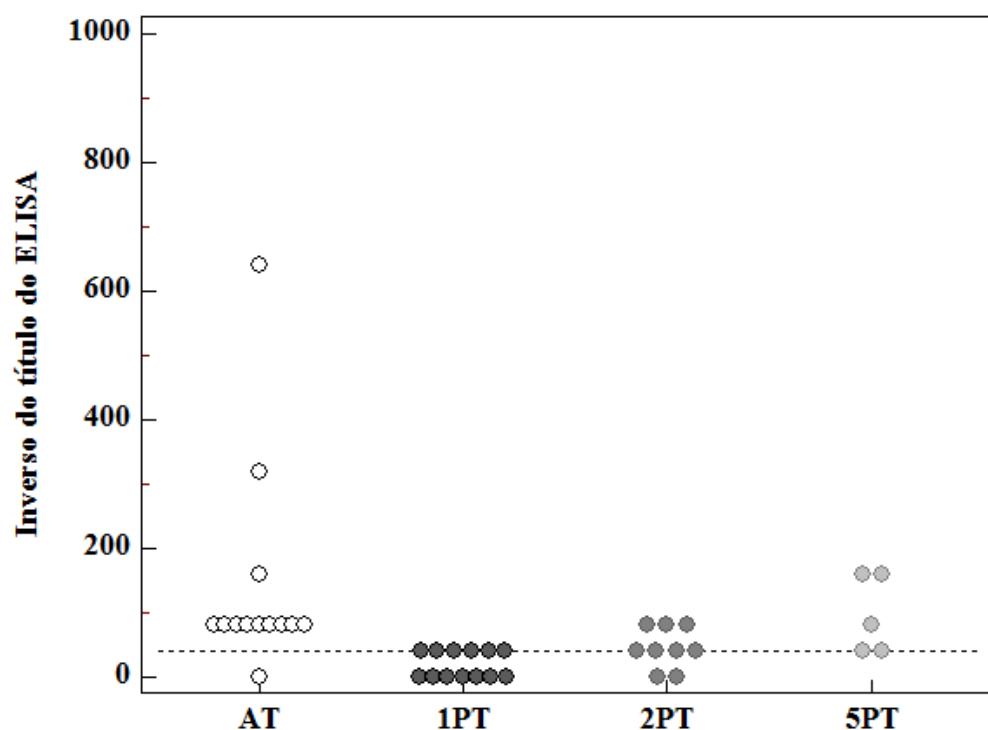
Positivos: **92,85%** **46,15%** **88,8%** **100%**

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: ELISA = ensaio imunoenzimático; AT = antes do tratamento; PT = pós-tratamento; NR = não-realizado; - = negativo.

Para avaliar a aplicabilidade do método de ELISA em identificar pacientes portadores de LTA ativa, foram realizados ensaios de ELISA utilizando soros de pacientes portadores de LTA AT e também 1, 2 e 5 anos PT, como demonstrados na Tabela 5. Como forma de obter uma melhor visualização dos dados obtidos avaliando a reatividade de IgG total dos soros dos pacientes AT e 1,2 e 5 anos PT para o teste de ELISA foi construído um gráfico a partir do programa estatístico MedCalc e utilizando o inverso do título da diluição em que os pacientes foram positivos para o teste (Figura 10).

Figura 10 – Resultados do ELISA para avaliar a reatividade de IgG em soros de pacientes antes e após tratamento.



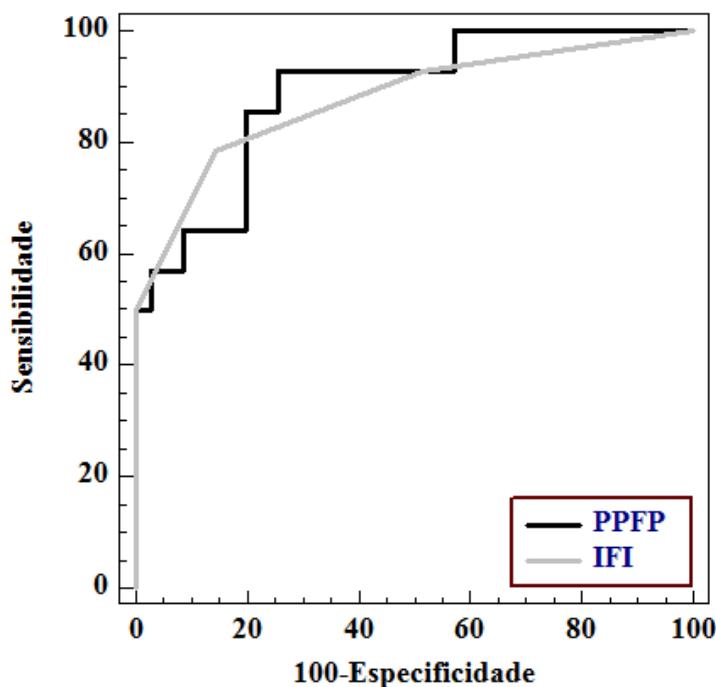
Fonte: Realizado pela autora através do software MedCalcStatistical.

Nota: Pacientes AT (antes do tratamento) e 1PT, 2PT e 5PT (após o tratamento) submetidos ao método de ELISA. A linha pontilhada corresponde ao ponto de corte de 1:40.

5.5. Análise das curvas ROC entre IFI e Citometria de Fluxo

Para realizar uma análise comparativa entre o desempenho dos testes de IFI e Citometria de Fluxo, foram construídas as curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para os testes (Figura 11). Para tal foram utilizados valores dos resultados dos títulos de IFI e citometria de fluxo na diluição do soro de 1:256, escolhida anteriormente. Com a análise das curvas ROC, observamos que área sob a curva (ASC) da IFI ($ASC=0,879$; $IC_{95\%}= 0,754-0,954$) diferiu daquela observada para a citometria de fluxo ($ASC= 0,890$; $IC_{95\%}= 0,767-0,961$). Com isso, pôde ser observado um desempenho menor para o teste de IFI em relação à citometria de fluxo.

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



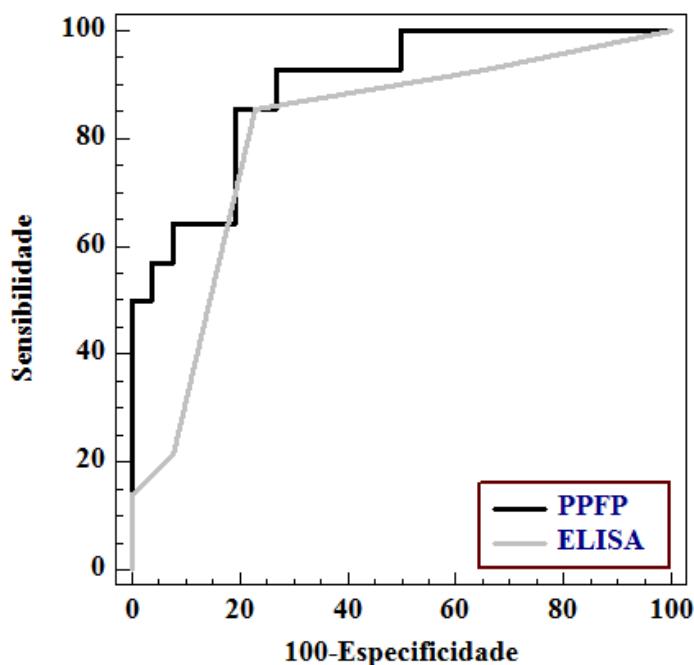
Fonte: Realizado pela autora a partir do programa MedCalc Statistical.

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

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

Para realizar a análise comparativa entre o desempenho dos testes de ELISA e Citometria de Fluxo, foram construídas as curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para os testes (Figura 12). Para tal, foram utilizados os valores dos resultados dos títulos de ELISA e citometria de fluxo. Com a análise das curvas ROC, observamos que área sob a curva (ASC) do ELISA ($ASC=0,808$; $IC_{95\%}= 0,652-0,915$) diferiu daquela observada para o teste de citometria de fluxo ($ASC= 0,896$; $IC_{95\%}= 0,758-0,970$). Com isso, foi observado uma acurácia maior da citometria em relação ao ELISA.

Figura 12 - Comparação entre as curvas ROC de ELISA e Citometria de Fluxo.



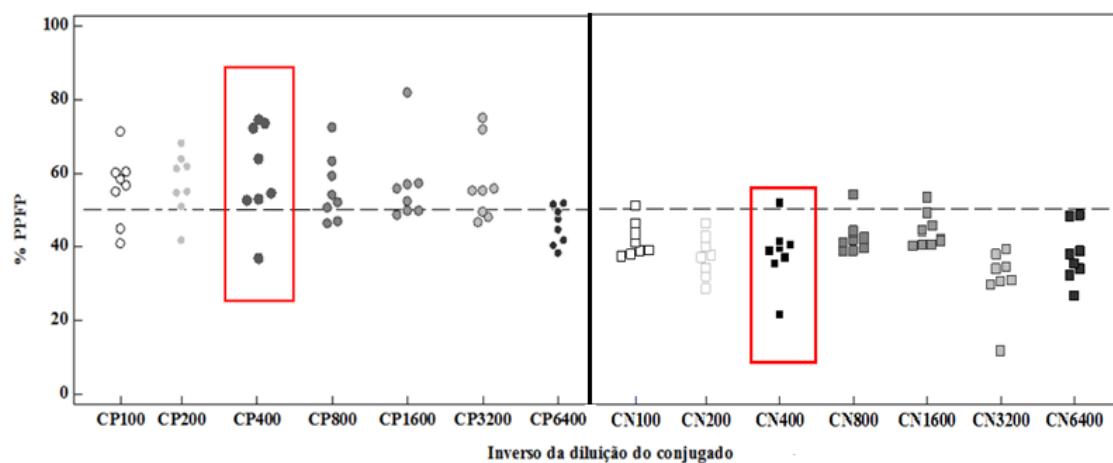
Fonte: Elaborado pela autora pelo programa MedCalc Statistical

Nota: Curvas construídas a partir do desempenho, sensibilidade e 100- especificidade dos testes avaliados. 0,89 e 0,80 correspondem às ASC (área sob a curva) da citometria de fluxo e ELISA, respectivamente.

5.7. Padronização do isotipo IgG1

Para realizar a padronização das condições dos ensaios de Citometria de Fluxo para o isotipo IgG1, primeiramente foram considerados positivos os soros dos pacientes que apresentaram a porcentagem de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) > 50%. A reatividade do ensaio de citometria de fluxo foi expressa a partir das diluições testadas do conjugado IgG1 (1:100 a 1: 6400) que foram obtidas após incubação com os soros de pacientes portadores de LTA ativa (CP - controle positivo) e com soros de indivíduos provenientes de áreas não endêmicas e sem manifestações clínicas de LTA (CN - controle negativo), nas diluições de 1:64 a 1:8192, com promastigotas fixadas em condições previamente padronizadas. A diluição do conjugado que melhor discriminou os pacientes positivos dos negativos foi a diluição de 1:400, como descrito na Figura 13.

Figura 13 – Padronização do Conjugado para o ensaio do isotipo IgG1.

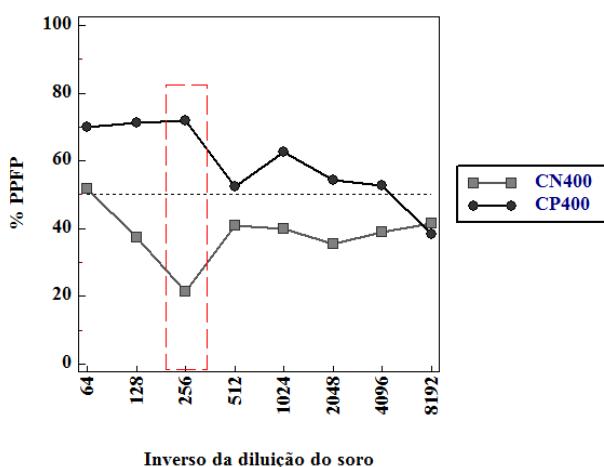


Fonte: Elaborado pela autora pelo programa MedCalc Statistical.

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

Utilizando a diluição do conjugado (PE) de 1:100, a análise da curva de titulação do anticorpo IgG1 expresso em valores de PPFP, sugere que a diluição 1:256 é a região (R) de reatividade que corresponde ao primeiro título de reação diferencial entre os indivíduos antes do tratamento (AT) (Figura 14).

Figura 14 - Curvas de titulação do isotipo IgG1.



Fonte: Elaborado pela autora.

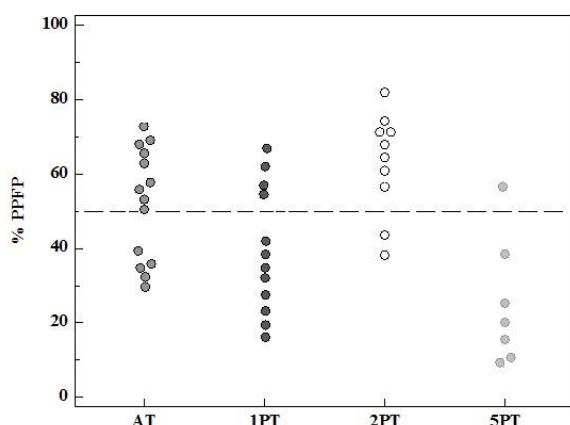
Nota: Curvas de titulação de anticorpos IgG1 anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes portadores de LTA (CP) e indivíduos saudáveis (CN). Isotipo IgG1 na titulação de 1:400. A linha tracejada corresponde ao ponto de corte de 50% de PPFP.

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

5.7.1. Avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG1

Após identificar a região de reatividade e o ponto de corte, prosseguimos com a confirmação da aplicabilidade do ensaio na identificação de pacientes positivos e negativos para LTA. Foi observado que nos pacientes AT, 63,2% foram positivos; nos pacientes um ano após tratamento, 17,7%; dois anos após tratamento, 72,8% e nos pacientes cinco anos após o tratamento, 12,5% foram positivos. Estes resultados podem ser observados na Figura 15.

Figura 15 - Avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG1 para CF.



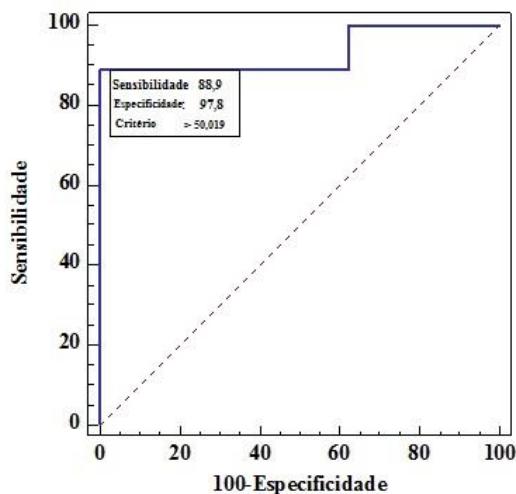
Fonte: Realizado pela autora através dos dados da pesquisa no programa MedCalc Statistical.

Nota: Ensaio realizado da avaliação da aplicabilidade do Isotipo IgG1 em identificar pacientes com LTA ativa. A partir dos soros de pacientes da região de reatividade com título diferencial entre AT e 1, 2 e 5 anos PT. A linha pontilhada corresponde ao ponto de corte de 50% de PPFP.

5.7.2. Estudo da curva ROC – Isotipo IgG1

Para avaliar a acurácia do teste de Citometria de Fluxo com base no Isotipo IgG1 para identificar pacientes portadores de LTA ativa foi realizada a construção da curva ROC (Figura 16) utilizando os valores dos resultados dos títulos da citometria de fluxo na diluição dos soros controles de 1:256. Assim, observamos que ASC (Área sob a curva) para o teste de citometria de fluxo foi de ASC= 0,931; IC_{95%}= 0,698-0,997 mostrando que o teste obteve um excelente desempenho.

Figura 16 - Curva ROC para o isotipo IgG1.



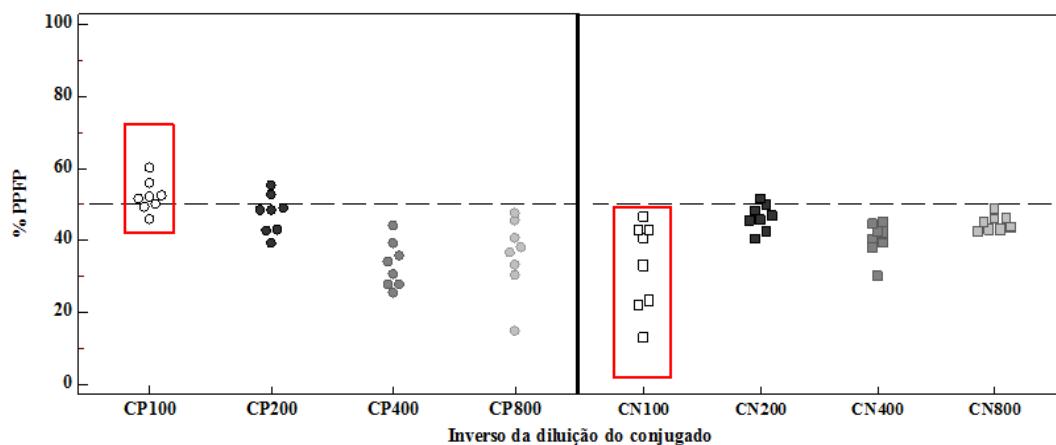
Fonte: Elaborado pela autora.

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

5.8. Padronização do Isotipo IgG2

Para realizar a padronização das condições requeridas nos ensaios de Citometria de Fluxo para o isotipo IgG2, primeiramente foram considerados positivos os soros dos pacientes que apresentaram a porcentagem de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) $> 50\%$. A reatividade do ensaio de citometria de fluxo foi expressa a partir das diluições testadas (1:100 a 1: 800) obtidas após incubação com os soros de pacientes portadores de LTA ativa (CP) e soros de indivíduos não infectados, de área não endêmica e sem manifestação clínica de LTA (CN) nas diluições de 1:64 a 1:8192, com promastigotas fixadas nas condições previamente padronizadas. A diluição do conjugado que melhor discriminou os grupos avaliados foi a diluição de 1:100, como descrito na Figura 17.

Figura 17 – Padronização do conjugado para o ensaio do isotipo IgG2.

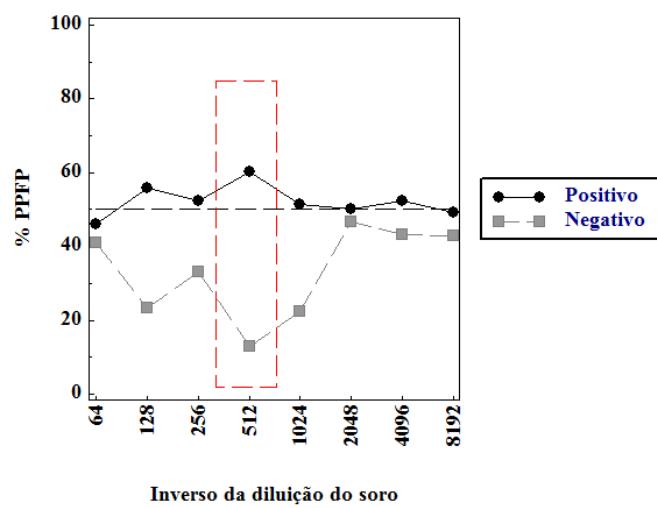


Fonte: Elaborado pela autora.

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

A análise da curva de titulação do anticorpo IgG2 anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes controles, expressos como os valores de PPFP, sugere que a diluição 1:512 é a região (R) de reatividade que corresponde ao primeiro título de reação diferencial entre os indivíduos AT (Figura 18).

Figura 18 - Curvas de titulação do isotipo IgG2.



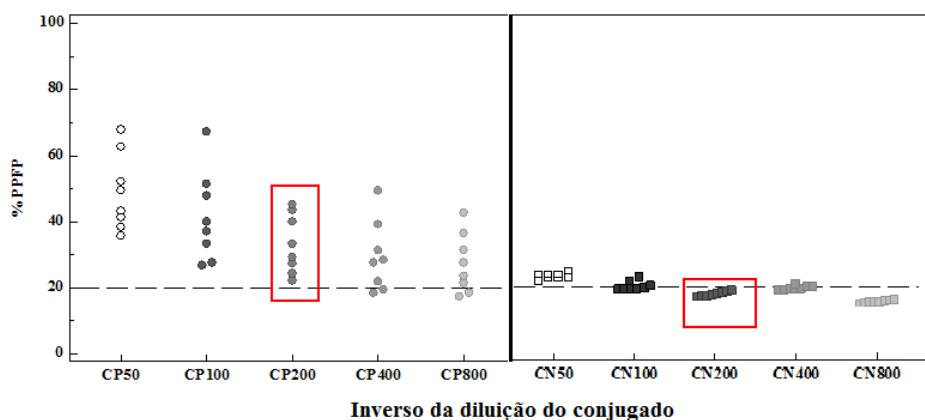
Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Curvas de titulação de anticorpos IgG2 anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes classificados quanto a presença de lesão (CP) e sem manifestação clínica (CN). Isotipo IgG2 na titulação de 1:100. A linha tracejada corresponde ao ponto de corte de 50% de PPFP.

5.9. Padronização do isotipo IgG3

Para realizar a padronização das condições requeridas nos ensaios de Citometria de Fluxo para o isotipo IgG3, primeiramente para o ensaio considerou-se positivo os soros dos pacientes que apresentaram a porcentagem de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) > 20%. Da mesma forma como para os demais isotipos, a reatividade do ensaio de citometria de fluxo, foi expressa a partir das diluições testadas do conjugado IgG3 (1:50 a 1: 800) obtidas após incubação com os soros CP e CN nas diluições de 1:64 a 1:8192, nas condições previamente padronizadas. A diluição do conjugado que melhor discriminou os grupos avaliados foi a diluição de 1:200, como descrito na Figura 19.

Figura 19 – Padronização do conjugado para o ensaio do isotipo IgG3.

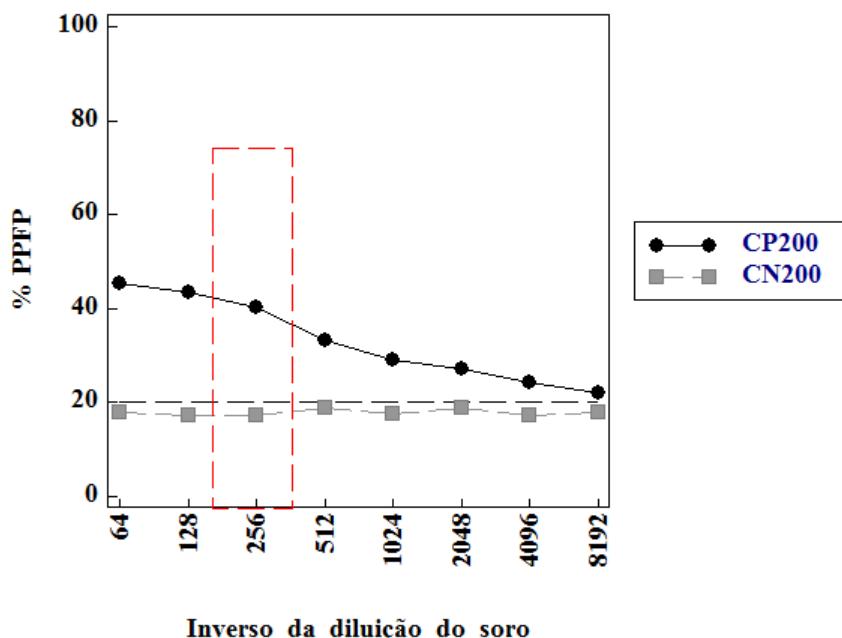


Fonte: Elaborado pela autora.

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

A análise da curva de titulação do anticorpo IgG3 anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes controles, expressos como os valores de PPFP, sugerem que a diluição 1:256 é a região (R) de reatividade que corresponde ao primeiro título de reação diferencial entre os indivíduos AT (Figura 20).

Figura 20 - Curvas de titulação do isotipo IgG3.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Curvas de titulação de anticorpos IgG3anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes classificados quanto a presença de lesão (CP) e sem manifestação clínica (CN). Isotipo IgG3 na diluição de 1:200. A linha tracejada corresponde ao ponto de corte de 20% de PPFP.

6. DISCUSSÃO

A *L. (V.) braziliensis* é a principal espécie envolvida em casos de LTA no Brasil e é capaz de desencadear desde infecções assintomáticas, até comprometer a pele com lesões cutâneas localizadas, disseminadas e difusas, como também se apresentar através de uma forma mais grave com lesões nas mucosas, denominada de forma mucocutânea (SOUZA *et al.*, 2013; ARONSON, 2016; BRASIL, 2017). Um grande problema associado a essa doença é o fato de que essas diferentes formas clínicas na rotina, podem ser facilmente confundidas com outras doenças como câncer de pele, esporotricose, sífilis, entre outras, além de que não existe uma técnica de diagnóstico considerada padrão-ouro, onde o diagnóstico final é obtido através de uma associação entre aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (NEVES, 2002; REITHINGER *et al.*, 2007, FERREIRA, 2018). Ao longo dos anos, diversas técnicas foram descritas para o diagnóstico da LTA com diferentes abordagens parasitológicas, moleculares e imunológicas, variando na precisão dos resultados (GONTIJO ; CARVALHO, 2003; DE VRIES., et al 2015; HANDLER., et al, 2015).

Destacando as abordagens imunológicas, Guitierrez *et al* (1991) demonstrou que ao realizar, através da técnica de IFI, a detecção e a análise quantitativa de anticorpos anti-*Leishmania* é possível avaliar o curso da infecção, como também fornecer dados sobre características da resposta imune. Com isso, estudos têm focado na análise desses anticorpos e diversos perfis de imunoglobulinas específicas para *Leishmania* foram detectadas em pacientes portadores de LTA em todas as manifestações clínicas da doença (TRUJILLO *et al.*, 2000; PEDRAS *et al.*, 2003; Souza et al., 2005; OZBILGE *et al.*, 2006; FAGUNDES-SILVA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015).

Trabalhos como os de SOUZA et al., 2005 e Pissinate *et al.*, 2008 observaram que todos os isotipos específicos anti-*Leishmania*, exceto IgD, são detectados no soro de pacientes com LTA, onde nas leishmanioses cutânea e mucocutânea a imunidade celular do tipo Th1 tem sido associada com a presença e predominância de isotipos IgG1, IgG2 e IgG3, já a resposta do tipo Th2 está atrelada com a presença de IgG4 para a leishmaniose cutânea difusa e que o uso dos isotipos de IgG aumentam a eficiência da técnica de diagnóstico imunológico.

A citometria de fluxo é uma tecnologia que vem sendo bastante explorada para o diagnóstico de diversas doenças, como demonstrado nos trabalhos de AMADOR-ORTIZ *et al* (2015), KEENEY; HEDLEY; CHIN-YEE (2017) e PORWIT *et al* (2014) que revelaram a aplicabilidade dessa técnica para o diagnóstico da leucemia. Além disso, MARTINS *et al* (2015) realizaram uma análise dos perfis de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* por citometria

de fluxo apontando a técnica como uma ferramenta importante para ser utilizada no diagnóstico da toxoplasmose ocular. No cenário do diagnóstico para LTA estudos como os de PEREIRA *et al.* (2012) e OLIVEIRA *et al.* (2013) demonstraram que através da citometria de fluxo (CF) é possível detectar anticorpos anti-*Leishmania* circulantes e monitorar a cura pós-tratamento da LTA, utilizando parasitos vivos e parasitos mortos fixados.

Além disso, os testes sorológicos tem se mostrado ferramentas importantes para o monitoramento dos pacientes ao longo da evolução da infecção até a cura. Trabalhos como o de Brito e colaboradores (2001) observaram uma redução nos títulos de IgG após os pacientes iniciarem o tratamento quimioterápico. Contudo, o uso dessas técnicas ainda é muito discutido, uma vez que há permanência de resultados positivos de alguns pacientes para os testes sorológicos convencionais, como a IFI e o teste de ELISA, principalmente aqueles de cura espontânea (MENDONÇA *et al.*, 2004; ROMERO *et al.*, 2005).

Assim, a proposta deste trabalho foi utilizar a citometria de fluxo como uma ferramenta alternativa para ser implementada no diagnóstico e também para determinar o critério de cura da LTA através do estudo dos isotipos da imunoglobulina G (IgG1, IgG2 e IgG3). Para avaliar a aplicabilidade da citometria em identificar pacientes portadores de LTA ativa, primeiramente se avaliou as condições para realização do ensaio, que seguiu o que foi descrito por Martins-Filhos (1995) e OLIVEIRA *et al* (2013). Foram observados resultados semelhantes através da análise da curva de titulação dos anticorpos IgG anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes, expressos como médias dos valores de PPFP, e assim a diluição do conjugado e o ponto de corte escolhidas para o teste seguiram o mesmo padrão como demonstrado no trabalho de OLIVEIRA *et al* (2013).

A partir desses resultados, foram realizados ensaios de citometria de fluxo com 51 pacientes e com o teste foi possível identificar como positivos os pacientes testados antes do tratamento (AT). Esses resultados, assim como resultados do trabalho de Rocha *et al* (2006), mostram a citometria de fluxo como uma técnica aplicável ao diagnóstico da LTA, por ser capaz de identificar os pacientes portadores de LTA ativa. Também utilizando a CF, foi possível identificar como negativo os pacientes analisados após o tratamento e esses resultados reforçam os trabalhos de Oliveira *et al* (2013) e Garcia *et al* (2009) que constataram o uso da CF para monitoramento dos títulos de pacientes portadores de LTA e LV, respectivamente, após o início do tratamento.

DE VRIES *et al* (2015) relatou que a IFI e o ELISA, testes mais utilizados na rotina laboratorial para o diagnóstico da LTA, manifestam controvérsias para o diagnóstico devido a

sensibilidade, especificidade e reproduzibilidade variáveis, como também, podem apresentar reações cruzadas com outros tripanossomatídeos. SRIVASTAVA P *et al* (2013) relatou que a variação da sensibilidade dessas técnicas está relacionada com o tipo de antígeno utilizado para o ensaio, com a forma clínica apresentada pelo paciente e com a espécie do parasita envolvido na infecção. BARROSO-FREITAS *et al* (2009) em seu trabalho constatou maiores valores de sensibilidade para ambos os testes quando se utilizava antígenos de *L. (V.) braziliensis* para diagnosticar a Leishmaniose cutânea.

Assim, foram realizados ensaios de IFI e ELISA utilizando antígenos totais de *L. (V.) braziliensis* com o intuito de comparar as suas melhores performances de diagnóstico para a LTA com a da CF. A comparação foi realizada através da construção de curvas ROC. E com a análise das curvas ROC entre a CF e a IFI, foi possível observar que a CF se mostrou uma ferramenta mais sensível e específica. Com isso, a acurácia para o teste de IFI foi menor em relação ao teste de citometria de fluxo, mostrando que quando este teste for validado, pode ser um candidato à rotina laboratorial de diagnóstico.

A sensibilidade da IFI encontrada no presente trabalho foi semelhante aos resultados de estudos como os de ROCHA *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2007; SZARGIKI *et al.*, 2009; BARROSO-FREITAS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2013 e embora não tenha sido encontrada uma grande diferença numérica entre a sensibilidade da CF e IFI , diversos trabalhos já descreveram variações de 56 a 84% na sensibilidade da IFI para formas cutâneas de *L. (V.) braziliensis* (GONTIJO *et al.* 2002; MENDONÇA *et al.* 1988; MOSLEH *et al.* 1995; CUBA-CUBA *et al.* 1984).

Nos resultados obtidos em relação à comparação das curvas ROC da citometria de fluxo com o teste de ELISA, foi observado novamente um melhor desempenho para a citometria de fluxo. Apesar do teste de ELISA ser a técnica que ao longo dos anos vem sendo mais utilizada na rotina laboratorial para o diagnóstico da LTA, já foi descrito que seus resultados são muito variáveis, como o teste de IFI (CHIARAMONTE MG *et al* ., 1999; PEDRAL- SAMPAIO *et al.*, 2016). Ainda há ausência de correlação entre níveis de anticorpos circulantes com a presença de infecção ativa (PASSOS *et al.*, 2000; SCHALLIG; OSKAM, 2002; SAVANI *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2014; DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

Uma das grandes problemáticas dos testes de diagnóstico sorológico para LTA é a presença de reatividade cruzada com outras doenças como a Doença de Chagas, Leishmaniose

Visceral e Toxoplasmose, devido ao fato de que os organismos causadores dessas doenças podem compartilhar proteínas semelhantes (SILVESTRE R *et al.*, 2009; REED, SG *et al.*, 1987; VIDIGAL,C *et al.*, 2008; PEDAL-SAMPAIO *et al.*, 2016; MEIRELES *et al.*, 2017). Gontijo *et al.*, 2002 reportaram uma reatividade de 21,5% para IFI em indivíduos sem manifestações clínicas para LTA e que eram residentes de área não endêmica para a doença.

Em contrapartida, o uso de formas promastigotas vivas ou fixadas do parasita se mostra uma importante ferramenta para redução da reatividade cruzada, pois garante que apenas抗ígenos da membrana do parasita serão expostos para ligação com o isótipos de IgG, evitando a reatividade cruzada com proteínas intracelulares que são mais comuns entre os diversos organismos da família Trypanosomatidae (ANDRADE *et al.*, 1988; CHIARAMONTE *et al.*, 1996; TAVARES *et al.* 2003). Sendo assim, é um recurso viável para armazenar grandes quantidades de抗ígenos. Além disso, o risco de infecção na manipulação é reduzido, reforçando o uso de preparações fixadas como fonte de抗ígeno para testes sorológicos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Essas abordagens têm sido utilizadas com sucesso para citometria de fluxo e tem se obtido redução da reatividade cruzada em relação aos testes de IFI e ELISA, como mostram LABRADA *et al.* (1989), DE LIMA BARROS *et al.* (2005), ROCHA *et al.*, 2006, PISSINATE *et al* 2008, OLIVEIRA *et al*, 2013 e PEDRAL-SAMPAIO *et al* 2016. Entretanto, não é descartada a possibilidade de reações cruzadas com outros organismos da família Trypanosomatidae na CF. Como Pereira *et al* (2012) descreveram, as técnicas de diagnóstico sorológico que alcançaram altos valores de especificidade ainda necessitam de ajustes metodológicos com o intuito de aprimorar sua atividade como ferramenta para o diagnóstico preciso e eficiente.

Em relação aos isótipos de IgG, trabalhos como o de Rodriguez *et al.* (1996) relataram uma correlação entre as subclasses de IgG com as diversas manifestações clínicas da LTA, onde são encontrados níveis elevados de anticorpos dos isótipos IgG1, IgG2 e IgG3 em soros de pacientes com LC. Segundo Pissinate *et al.*, (2008) a frequência de detecção das subclasses de IgG na LTA é de IgG1 > IgG3 > IgG2 = IgG4 e foi observado que o uso dos isótipos de IgG aumentam a eficiência da técnica de diagnóstico.

Assim, foi realizada a padronização das condições para os ensaios com o isótipo IgG1 por citometria de fluxo, avaliando qual seria melhor diluição do conjugado do isótipo IgG1 para ser utilizada no ensaio e a diluição do soro considerada região (R) de reatividade. Além disso, também foi determinado o ponto de corte ideal, onde ambos permitiam melhor

discriminar os pacientes positivo dos negativos. Todos os resultados obtidos para a padronização se mostraram semelhantes ao padrão de resultados obtidos no trabalho de Oliveira *et al* (2013).

Diante desses resultados, foi possível observar através da análise da curva ROC, um valor da ASC = 0,931, mostrando excelentes resultados de especificidade e sensibilidade para o teste utilizando o Isotipo IgG1. Logo, para a avaliação da aplicabilidade da utilização deste isotipo por citometria de fluxo, foi observado que o teste conseguiu detectar como positivo para LTA pacientes antes do tratamento, como também, pacientes submetidos ao tratamento por um período um, dois e cinco anos. Dessa forma, os resultados observados para o Isotipo IgG1 mostram que é necessário realizar ensaios com um número maior de amostras, porém essa abordagem já desperta perspectivas para o seu uso no diagnóstico e também como determinação de um critério de cura da doença.

Para a padronização dos isotipos IgG2 e IgG3, semelhante ao que foi realizado para o isotipo IgG1, foi determinado a diluição do conjugado que melhor discriminou os pacientes dos grupos do controle positivo do controle negativo. Como também, avaliou a diluição do soro que representa a região (R) de reatividade para cada isotipo. Devido às dificuldades com relação à manutenção das culturas de *L. (V.) braziliensis*, além do fato da quantidade desses isotipos nos soros dos pacientes se mostrar inferior ao isotipo IgG1 (SOUZA *et al.*, 2005; PISSINATE *et al.*, 2008; ABBAS *et al.*, 2015), não foi possível realizar a avaliação da aplicabilidade desses isotipos até o momento, permanecendo como perspectivas do grupo.

Ainda que as metodologias que utilizam a citometria de fluxo como método de diagnóstico sejam mais caras em comparação com os outros métodos sorológicos, como o teste de IFI e o teste de ELISA, ao longo dos anos, muitos laboratórios e centros de pesquisas buscaram investir no equipamento devido ao crescente número de trabalhos publicados explorando as vantagens do uso dessa ferramenta para as diversas áreas das ciências da saúde (SANTEGOETS, *et al.*, 2015; HOFFMANN, H. J. *et al.*, 2015; FLORES-MONTERO *et al.*, 2017), principalmente na área para o diagnóstico das Leishmanioses, como mostram os trabalhos de PEREIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Assim, todos esses resultados evidenciam que a expansão do uso da citometria de fluxo irá contribuir, cada vez mais, para o emprego de novas metodologias em laboratórios convencionais, proporcionando uma expansão no desenvolvimento tecnológico para as práticas da rotina laboratorial.

De maneira geral, com os resultados obtidos no presente trabalho, foi possível sugerir a citometria de fluxo para o diagnóstico da LTA, além de demonstrar que a utilização do isotipo IgG1 pode contribuir como um método de diagnóstico mais específico e sensível do que os métodos utilizados na rotina laboratorial. Permanecendo ainda como perspectiva, realizar mais estudos com os isótipos IgG2 e IgG3 com um maior número de amostras. Mesmo assim, com os resultados obtidos no trabalho já foi observado que ambos apresentam muitas expectativas de serem implementados na detecção e caracterização da doença nos pacientes (TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015; DATTA *et al.*, 2015; LIMA, M P. *et al*, 2018).

7. CONCLUSÕES

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

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015.
- AL-JAWABREH A, DUMAIDI K, EREQAT S, *et al.*: Molecular epidemiology of human cutaneous leishmaniasis in Jericho and its vicinity in Palestine from 1994 to 2015. **Infect Genet Evol**; 50: 95–10, 2017.
- ALKEMADE, J. A. H. The second moment for the Meyer-König and Zeller operators. **Journal of approximation theory**, v. 40, n. 3, p. 261-273, 1984.
- AMADOR-ORTIZ, Catalina *et al.* Flow cytometric analysis of lymphoid enhancer-binding factor 1 in diagnosis of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. **American journal of clinical pathology**, v. 143, n. 2, p. 214-222, 2015.
- AMATO, V. S. D., M.I.; NICODEMO, A.C.; DE CARVALHO L.V.; PAGLIARI, C.; DA MATTIA V.L.; DE OLIVEIRA L.S.; DE CASTRO, S.M.; UIP, D.E.; AMATO, J.G.; AMATO NETO, V. An evaluation of clinical, serologic, anatopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 23-30, Jan/Fev 1998.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.
- ANDRADE, C.R., ANDRADE, P.P., WRIGHT, E.P. Leishmania donovani donovani antigens recognized by kala-azar patient sera and identification of crossreacting antigens to Chagas' disease. **Braz. J. Med.** 21, 511, 1988.
- ANDRADE, M.S. et al. New outbreak of American tegumentary leishmaniasis in a military training center in the Zona da Mata region, in the north of the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 594-596, Set-Out, 2009.
- ANDRADE, T. A. S. *et al.* Perfil epidemiológico dos casos notificados de leishmaniose tegumentar americana no município de Igarassu (PE) no período de 2008 a 2010. **Scire Salutis**, Aquidabã, v. 2, n. 2, pp. 5-15, 2012.
- ARONSON, Naomi *et al.* Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical infectious diseases**, v. 63, n. 12, p. e202-e264, 2016.

AZEVEDO, A. C. *et al.* The sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous *Leishmaniasis* in Ilheus, state of Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 75-79, 1996.

BACELLAR O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollog KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect Immun** **70**: 6734-6740, 2002

BAHRAMI, Fariborz; HARANDI, Ali M.; RAFATI, Sima. Biomarkers of Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 222, 2018.

BARRAL A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **Int J Dermatol.** jul; 34(7): 474-9, 1995.

BARROSO-FREITAS, A. P. T. et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 383-389, 2009.

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

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

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – **Editora do Ministério da Saúde**, 2017.

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

BRITO, M. E. F., *et al.* Occupationally acquired American cutaneous leishmaniasis. **Case reports in dermatological medicine**, v. 2012, 2012.

CAMAROO, E. P. et al. Growth and Differentiation in Trypanosoma cruzi-I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 6, n. 3, p. 93-100, 1964.

CAMPANELLI AP, ROSELINO AM, CAVASSANI KA, *et al.* CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **J Infect Dis**; 193: 1313–1322. 2006.

CASTELLANO, L. R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. **Human Immunology**, New York, v. 70, n. 6, p. 383-390, 2009.

CHARMOY, M. *et al.* Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. **PLoS Pathog.** 6, e1000755, 2010.

CHIARAMONTE MG, FRANK FM, FURER GM *et al.* Polymerase chain reaction reveals Trypanosoma cruzi infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. **Acta Tro**; 72(3):295–308, 1999.

CHIARAMONTE, M.G., ZWIRNER, N.W., CAROPRESI, S.L., *et al.* Trypanosoma cruzi and Leishmania spp. human mixed infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 54, 271, 1996.

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

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

CUBA CUBA, C. A.; MARSDEN, P. D.; BARRETO, A. C *et al.* Diagnóstico Parasitológico E Inmunológico De Leishmaniasis Tegumentar Americana. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 89, n. 3, p. 195–208, 1980.

DA SILVA SANTOS, Claire; BRODSKYN, Cláudia Ida. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in public health**, v. 2, p. 165, 2014.

DATTA, SOUVIK *et al.* Identification and glycobiological characterization of circulating immune complexes in patients with visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis. 2015.

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

DE LUCA, P. M.; MACEDO, A. B. B. Cutaneous *Leishmaniasis* Vaccination: A Matter of Quality. **Front. Immunol.**, Lausanne, v. 7, p. 151, 2016.

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

DE SOUZA CARMO, E. V., Katz, S. & Barbieri, C. L. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. **PLoS ONE** 5, e13815, 2010.

DE VRIES, Henry JC; REEDIJK, Sophia H.; SCHALLIG, Henk DFH. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **American journal of clinical dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99-109, 2015.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 27,305–318, 2004.

DIRO, Ermias et al. Secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis relapses in HIV co-infected patients using pentamidine as a prophylactic agent: a prospective cohort study, 2018.

DIRO, Ermias et al. Use of pentamidine as secondary prophylaxis to prevent visceral leishmaniasis relapse in HIV infected patients, the first twelve months of a prospective cohort study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004087, 2015.

DUQUE, Maria Cristina de Oliveira et al. Standardization of intralesional meglumine antimoniate treatment for cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 774-776, 2016.

EVANS, Krystal J.; KEDZIERSKI, Lukasz. Development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Journal of tropical medicine**, v. 2012, 2012.

FABER, William R. et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, n. 1, p. 70-74, 2003.

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

FALCI, Diego Rodrigues; PASQUALOTTO, Alessandro Comaru. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical and biomedical research. Porto Alegre. Vol. 35, n. 2,(2015), p. 65-82**, 2015.

FLORES-MONTERO, Juan *et al.* Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. **Leukemia**, v. 31, n. 10, p. 2094, 2017.

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

FERREIRA, Flávia Regina et al. Leishmaniose Tegumentar Americana: Uma Doença Polimorfa. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**, v. 76, n. 2, p. 177-180, 2018.

GADELHA, Alcidarta dos Reis et al. Tratamento da leishmanise tegumentar americana com injeções intralesionais de n-metil-glucamina. **An bras dermatol**, v. 65, n. 4, p. 201-3, 1990.

GARCIA, Lúcia Maria 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. **Journal of immunological methods**, v. 350, n. 1-2, p. 36-45, 2009.

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

GOLLOB, Kenneth J. et al. Immunoregulatory mechanisms and CD4- CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 10, p. 1338-1343, 2008.

GOMES, M. L. et al. Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 60, p. 205-210, 1999.

GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro de. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

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

GUTIERREZ, Y. et al. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 45, n. 3, p. 281-289, 1991.

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

HANDLER, MARC Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American academy of dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911-926, 2015.

HOFFMANN, H. J., et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. **Allergy**, v. 70, n. 11, p. 1393-1405, 2015.

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

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

KAWANO, Yutaka; NOMA, Takeshi; YATA, Junichi. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. **The Journal of Immunology**, v. 153, n. 11, p. 4948-4958, 1994. *Lancet* 366, 1561–1577 , 2005.

KEENEY, M.; HEDLEY, B. D.; CHIN-YEE, I. H. Flow cytometry—recognizing unusual populations in leukemia and lymphoma diagnosis. **International journal of laboratory hematology**, v. 39, p. 86-92, 2017.

KOSTMAN R, BARR M, BENGTSON E, GARNHAM PCC, HULT G. Kala-azar transferred by exchange blood transfusion in two Swedish infants. In: *Proceedings of the seventh international congress of tropical medicine and malaria*. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**; p. 384, 1963.

LABRADA, M.; WEIGLE, K.; VALDERRAMA, L.; SARAVIA, N.G. Evaluation of immunoglobin isotype specific to Leishmania in tegumentary American leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 84, 409. 1989.

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

LIEW FY. Regulation of cell-mediated immunity in Leishmaniasis. **Curr Top Microbiol Immunol** 155: 53-64, 1990.

LIMA, MARIANA P. et al. Diagnostic application of recombinant Leishmania proteins and evaluation of their in vitro immunogenicity after stimulation of immune cells collected from tegumentary leishmaniasis patients and healthy individuals. **Cellular immunology**, 2018.

LUZ KG, da Silva VO, GOMES EM, MACHADO, FC, ARAUJO MA, FONSECA, H, et al. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. **Am J Trop Med Hyg**; 51 : 168-71, 1997.

MANSUETO, P. et al. Leishmaniasis in travelrs: A literature review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, p. 563- 581, 2014.

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

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

MARTINS, Livia Mattos *et al.* Specific IgM, IgG and IgG1 directed against Toxoplasma gondii detected by flow cytometry and their potential as serologic tools to support clinical indirect fundoscopic presumed diagnosis of ocular disease. **Journal of immunological methods**, v. 417, p. 97-106, 2015.

MARTINS-FILHO, Olindo Assis *et al.* Differential diagnostic method and kit for infectious and parasitic diseases, using flow cytometry. **U.S. Patent n. 9,588,116**, 7 mar. 2017.

MARZOCHI MC. Leishmanioses no Brasil: As Leishmanioses Tegumentares. **J Bras Med.** 63(5-6): 82-104, 1992.

MARZOCHI MCA, MARZOCHI KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroponozoonosis and possibilities for their control. **Cad Saúde Pública**. 10:359—75, 1994.

MATARRAZ, SERGIO *et al.* Introduction to the diagnosis and classification of monocytic-lineage leukemias by flow cytometry. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 92, n. 3, p. 218-227, 2017.

MCMAHON-PRATT, Diane; ALEXANDER, James. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease?. **Immunological reviews**, v. 201, n. 1, p. 206-224, 2004.

MEIRELES, Camilla Barros *et al.* Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Acta tropica**, v. 172, p. 240-254, 2017.

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

MOSLEH IM; SALIBA EK; AL-KHATEEB MS, *et al.* Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in Jordan using indirect antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. **Acta Tropica** 59, 163–172, 1995.

MOTA, L. A. A.; MIRANDA, R. R. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia (Impr.)**, São Paulo, v. 15, n. 3, pp. 376-381, 2011.

MOUGNEAU, E; et al. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 286-296, 2011

MURRAY, Henry W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

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

NAKAMURA, Kazuhiko; KITANI, Atsushi; STROBER, Warren. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4+ CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 5, p. 629-644, 2001.

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

NEVES, J. et al. **Parasitologia Dinâmica**, 3 ed., São Paulo: Atheneu, 2009.

NOVAIS, Fernanda O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against Leishmania braziliensis infection. **The journal of immunology**, v. 183, n. 12, p. 8088-8098, 2009.

NOVAIS, F. O. et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **J. Infect. Dis.** **209**, 1288–1296 , 2014.

NOVAIS, Fernanda O.; SCOTT, Phillip. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. In: **Seminars in immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg. p. 251-259, 2015.

NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 34, n. 12, p. 551-561, 2012.

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

OLIVEIRA LF, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Trop** 118: 87–96. 2011.

OLIVEIRA, B. C. et al. American Tegumentary Leishmaniasis and Flow Cytometry: A Review. **J Med Microb Diagn**, v. 5, n. 222, p. 2161-0703.1000222, 2016.

OLIVEIRA, B. C. et al. American Tegumentary Leishmaniasis and Flow Cytometry: A Review. **J Med Microb Diagn**, v. 5, n. 222, p. 2161-0703.1000222, 2016.

OLIVEIRA, W. N. *et al.* The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary *Leishmaniasis*. **Cytokine**, Philadelphia, v. 66, n. 2, p. 127–132, 2014.

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

ORYAN A, AKBARI M: Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pac J Trop Med.**; 9(10): 925–32. 2016.

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

PANIZ MONDOLFI, Alberto E. et al. Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. **International journal of dermatology**, v. 52, n. 4, p. 446-455, 2013.

PEDRAL-SAMPAIO, G *et al.* Detection of IgG Anti-Leishmania Antigen by Flow Cytometry as a Diagnostic Test for Cutaneous Leishmaniasis. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162793, 2016.

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

PEREIRA, V. R. *et al.* Evaluation of anti-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. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 74, n. 3, p. 292-8, Nov 2012.

PETERS, N. C. *et al.* *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science** 321, 970–974, 2008.

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

PORWIT, Anna *et al.* Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes—proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. **Leukemia**, v. 28, n. 9, p. 1793, 2014.

PROBST, Peter et al. A *Leishmania* protein that modulates interleukin (IL)-12, IL-10 and tumor necrosis factor- α production and expression of B7-1 in human monocyte-derived antigen-presenting cells. **European journal of immunology**, v. 27, n. 10, p. 2634-2642, 1997.

REED SG; BADARO R; LLOYD RM. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. **J Immunol.** 138(5):1596–601, 1987.

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

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

ROCHA, F. J., Schleicher, U., Mattner, J., Alber, G. & Bogdan, C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infect. Immun.** 75, 3823–3832, 2007.

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

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

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

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

ROGERS, Kathleen A. et al. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS microbiology letters**, v. 209, n. 1, p. 1-7, 2002.

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

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

SAKAGUCHI S, et al. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, 133, 775- 787. 2008.

- SANDE, M. A.; MANDELL, G. L. Drogas antimicrobianas–Drogas antimicóticas e antivirais. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 799-807, 1987.
- SANTEGOETS, SASKIA JAM., et al. Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 64, n. 10, p. 1271-1286, 2015.
- SANTOS, S. C.; BRODSKYN, C. I. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 1-6, 2014.
- SAVANI, E. S. M. M., et al. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v.37, n.2, p.260-262, 2003.
- SCHALLIG, Henk DFH; OSKAM, Linda. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine & International Health**, v. 7, n. 8, p. 641-651, 2002.
- SCHUBACH, Armando et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of Leishmania (Viannia) braziliensis persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 58, n. 6, p. 824-827, 1998.
- SILVESTRE R, et al . Evaluation of Leishmania species reactivity in human serologic diagnosis of leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**. 81 (2):202–8, 2009.
- SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, v.27, p.1135-1145, 1997
- SINGH, Sarman et al. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **India Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 311, 2006.
- SIVAKUMAR R. Studies on the kinesin related antigen gene of *Leishmania donovani* and its diagnostic application. **India Institute of Medical Sciences**, New Delhi, India. PhD Thesis 2004.
- SOTO, Jaime et al. Intralesional pentamidine: A novel therapy for single lesions of Bolivian cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.94, n.4, p.852-856. 2016.
- SOUSA, S. et al. Development of a fluorescent based immunosensor for the serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and flow cytometry. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2371, 2013.

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

SRIVASTAVA P, GIDWANI K, PICADO A, et al. Molecular and serological markers of Leishmania donovani infection in healthy individuals from endemic areas of Bihar. **India Trop Med Int Health.** 2013;18(5):548–54, 2013.

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

TAVARES CA, FERNANDES AP, MELO MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. 3, 657– 667, 2003.

TEIXEIRA-CARVALHO, Andréa et al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of chagas disease and leishmaniasis. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0122938, 2015.

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

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

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

VASCONCELOS, Patrícia Pereira; ROCHA, Francisca Janaína Soares; DE ARAÚJO, Natália Jerônimo. Ocorrência e comportamento sociodemográfico de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Vicência, Pernambuco, no período de 2007 a 2014. **Semana: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 38, n. 1, p. 105-114, 2017.

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

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

VIDIGAL CDE P, MARCUSSI VM, MARCUSSI LM et al. Enzyme immunoassay using Leishmania (Viannia) braziliensis antigens for laboratorial diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.** 107(2):208–12, 2008.

VON STEBUT, E, *et al.* Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. **J. Exp. Med.** 188, 1547–1552, 1998.

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

ZER R, Yaroslavski I, Rosen L, Warburg A. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. **Int J Parasitol**, 31, 810-814, 2001.