



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO MULTIDISCIPLINAR EM
PATOLOGIA TROPICAL



KARINA CAMARA DA MOTA

**Resposta imune humoral na Leishmaniose Tegumentar humana causada
por *Leishmania (Viannia) guyanensis* no município de Manaus, AM –
Brasil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração Diagnóstico e Controle.

Orientação: Dr^a Antonia Maria Ramos Franco

MANAUS

Dezembro / 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

M917

Mota, Karina Camara da

Resposta imune humoral na Leishmaniose Tegumentar humana causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* no município de Manaus, AM-Brasil / Karina Camara da Mota .--- Manaus : [s.n.], 2008.

65 f. : il.

Dissertação (mestrado) --- UFAM, Manaus, 2008

Orientador : Antonia Maria Ramos Franco

Área de concentração : Diagnóstico e Controle

1. Leishmaniose tegumentar. 2. Imunoglobulinas, 2. *Leishmania*, 3 Resposta humoral.

I. Título.

CDD 19. ed. 616.9364

KARINA CÂMARA DA MOTA

**Resposta imune humoral na Leishmaniose Tegumentar humana causada por
Leishmania (Viannia) guyanensis no município de Manaus, AM – Brasil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração Diagnóstico e Controle.

Apresentada em 18 de dezembro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Antonia Maria Ramos Franco, Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof^a Dra. Flávia Regina Almeida C. N. Moreira, Membro Externo
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a Dra. Adriana Malheiros, Membro Externo
Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

DEDICATÓRIA

A Deus, que dá ao homem conhecimento e ensina ao mortal a compreensão, por ser o meu caminho, minha verdade e a minha vida.

A toda minha família, por muitos motivos... amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado em mais essa caminhada;

À minha maravilhosa mãe, Dona Graça, que sempre tive como referencial em minha vida, pelo incentivo, apoio e amor incondicional;

Ao meu paizão, Sr. Mota que sempre me cobrou bons resultados, isso foi o início de tudo...

A meu irmão, Igor Mota, por sempre se sentir orgulhoso de sua mana;

Aos meus avós, Diomar, Haydèe Câmara e Alba Mota, por terem feito parte da melhor fase da minha vida;

Ao Arquidor Leão, meu esposo amado, que nunca me deixou desistir e sempre acreditou em minha capacidade, até mais do que eu mesma!

À Gabriela, princesinha da mamãe, ser iluminado, que sempre me apoiou, me encorajou e que por incrível que pareça me deu muito colo e enxugou minhas lágrimas nos momentos difíceis;

Ao meu lindo moleque, Ruy, que se não existisse teria de ser inventado só para eu poder desfrutar de seu lindo sorriso e sua alegria contagiante;

Aos meus sogros, em especial, à minha adorável sogra Elza Leão, indispensável nessa caminhada, por seu apoio e por estar sempre presente ao lado de meus filhos nos meus momentos de ausência;

À Dra. Antonia M. Ramos Franco, querida orientadora, a quem atribuo grande contribuição em minha formação. Obrigada pela confiança, persistência e amizade;

À Msc. Maricleide de Farias Naiff, por ter me apresentado ao mundo da pesquisa, pela sua amizade e confiança;

A todos do laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas: Aninha, Artêmio, Cândido, Francisco, Lourival, Paulo Edson, Plínio, Robertinho, Dr. Ruy, e em especial ao nosso querido Paulo Albuquerque (Paulão) que nos deixou a contra gosto. Por tudo que fizeram por mim nestes belos anos de convivência;

Às queridas companheiras de labuta do laboratório que sempre me ajudaram: Luanda, Flávia, Liliane, Francimeire, Sônia, Alana, Ana Cláudia, Nívea, Lílian, Sheila e Renata. Sempre prestativas, colaborando em várias etapas;

A coordenação do curso de Mestrado em Patologia Tropical, pelo apoio e oportunidade.

Ao CNPq, pela bolsa, que foi de grande ajuda para custear meus estudos.

A todos, muito obrigada!!!!

A ESTRADA

Você não sabe o quanto eu caminhei pra chegar
até aqui.

Percorri milhas e milhas antes de dormir

Eu nem cochilei.

Os mais belos montes escalei.

Nas noites escuras de frio chorei, ei , ei...

A vida ensina e o tempo traz o tom pra nascer
uma canção.

Com a fé do dia-a-dia encontro a solução,
encontro a solução...

Meu caminho só meu pai pode mudar

Meu caminho só meu pai

Meu caminho só meu pai...

(Toni Garrido / Lazão / Da Gama / Bino)

RESUMO

Os protozoários do gênero *Leishmania*, compreendem uma vasta diversidade de espécies e estão relacionados com a forma clínica da leishmaniose (LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana e LV- Leishmaniose Visceral) diferindo quanto a distribuição geográfica, aos hospedeiros e vetores envolvidos, com variações nas taxas de incidência e mortalidade de acordo com a região. Apesar da ampla variedade de formas clínicas encontradas em pacientes com LTA, podemos agrupá-las em três tipos básicos: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). O perfil da resposta imunológica na leishmaniose cutânea difere na ativação de linfócitos T CD4⁺ Th1 ou Th2. As células Th1 e Th2 se identificam segundo o perfil de citocinas que elas secretam, os linfócitos Th1 produzem fundamentalmente citocinas ativadoras da imunidade mediada por células tais como o INF- γ , INF α , IL-2 e IL12. Por outro lado, a suscetibilidade à infecção está relacionada à resposta de célula Th2, que secretam citocinas do tipo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β , promovendo a resposta de anticorpos. Por outro lado, na leishmaniose mucosa há um mistura de perfil de resposta Th1 e Th2, antes e após tratamento, com altos índices de IgA. Dados de literatura demonstram que existe uma correlação positiva entre altos índices de IgE e a reação de Montenegro, sugerindo que antígenos orientam a resposta T CD4⁺ para um perfil Th2.

Desta forma, buscou-se detectar níveis séricos de isotipos de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA e IgE) em amostras de soros de pacientes infectados com Leishmaniose cutânea e mucosa causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis*, proveniente do município de Manaus, estado do Amazonas, Brasil. A técnica empregada foi o ELISA. Esta técnica utiliza extratos ou frações antigênicas do parasita.

Este estudo demonstrou que a técnica sorológica pelo método de ELISA utilizando como substrato OPD é sensível para detectar a presença de imunoglobulinas séricas IgG e IgM em humanos infectados com a *Leishmania (Viannia) guyanensis* assim como a infecção por esta espécie leva a produção de baixo níveis de IgG e IgM, não devendo ser considerada como método útil no diagnóstico e sim como acompanhamento da evolução da infecção.

Palavras chave: 1. Leishmaniose tegumentar. 2. Imunoglobulinas, 3 Resposta humoral.

ABSTRACT

The protozoa of the genus *Leishmania* has a great diversity of species and are related with the clinical form of American tegumentary Leishmaniasis (ATL) and Visceral Leishmaniasis (VL) distinguish through the geographical distribution, the reservoir hosts and the vectors involved in the cycle, with incidence and mortality variation according with the region. Although the clinical variation forms found in patients with ATL the illness could be grouped in three basic types: cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (ML) and diffuse cutaneous leishmaniasis. The immune response profile differs in the lymphocyte activation of TCD4+ Th1 or Th2. The Th1 and Th2 cells could be identified through the secreted cytokines, the Th1 lymphocytes produced activators cytokines by immunity cells mediated as well as the INF γ , INF α , IL-2 and IL-12. However the infection susceptibility is related to Th2 cell response that secreted cytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF-B, promoting the antibody response. In the mucosal leishmaniasis has a mixture of Th1 and Th2 response profile, before and after treatment, with high levels of IgA. The literature shows that there is a positive correlation between the high levels of IgE and the Montenegro reaction, suggesting that these antigens guide the TCD+ response to a Th1 profile.

For this one, the levels of immunoglobulins isotypes (IgG, IgM, IgA and IgE) were measured in the serum samples of 36 patients infected with cutaneous and mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis*, from the Manaus municipality, Amazonas State, Brazil. The techniques employed were ELISA and Western Blotting.

This study showed low levels of IgM and IgG in patients infected with L.(V.) guyanensis by the ELISA method using the OPD substrate that was sensible to detect the serum immunoglobulins, for this method could not be used as diagnostic but is indicated to follow-up the infection evolution.

Key-words: 1 Tegumentary Leishmaniasis, 2. immunoglobulins, 3. Humoral response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Formas clínicas da Leishmaniose no Brasil (Marzochi,2001;MSB,2007)..	26
Figura 2.	Percentual de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> agrupados por sexo.....	40
Figura 3.	Percentual de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana causado por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> de acordo com sexo, faixa etária e forma clínica.....	42
Figura 4.	Distribuição em percentual dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana diagnosticados no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, no período de novembro de 1985 a março de 1996 por faixa etária segundo o Ministério da Saúde (1993). Faixa I (criança): 1-12 anos; Faixa II (pré-adolescente): 12 a 15 anos; Faixa III (adolescente): 15 a 19 anos; Faixa IV (adulto): 20-59 anos e Faixa V (maduro): mais de 60 anos.....	43
Figura 5.	Mapa do município de Manaus com casos de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> distribuídos por localidade. As legendas representadas por números encontram-se discriminadas na tabela 4 e foram agrupadas de acordo com as áreas de transmissão (zonas da cidade de Manaus, Rodovias AM010 e BR174). Mapa do Google earth/Landsat.....	44
Figura 6.	Distribuição de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana quanto a profissão/ocupação/atividade.....	45
Figura 7.	Níveis séricos de IgG, na diluição de 1:40 em soros de pacientes controles (Tabela 1.) do teste de ELISA.	47
Figura 8.	Níveis séricos de IgG (em diferentes diluições) detectados pelo método de ELISA em pacientes com a forma clínica mucosa contígua de Leishmaniose causada por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . Valores de Cut-off em diferentes diluições 1:10 = 0,026; 1:20=0,0056 1:40=0,0062 e 1:80=0,023166.....	48
Figura 9.	Títulos de IgG pelo método de ELISA de casos de Leishmaniose Tegumentar em indivíduos que não realizaram a intradermoreação. Valores de Cut-off em diferentes diluições diluição 1:20: 0,0066; 1:40: 0,0037; 1:80: 0,0025.....	49
Figura 10.	Título de IgG (diluição 1:20) pelo método de ELISA de casos de	

	Leishmaniose agrupados de acordo com os valores de enduração obtidos pela IDR. Valor do Cut-off na diluição de 1:20 : 0,006.....	50
Figura 11.	Títulos de IgG na diluição de 1: 20, pelo método de ELISA de casos de Leishmaniose Tegumentar em indivíduos em fase aguda e crônica. Valor do Cut-off na diluição de 1:20: 0,005.....	51
Figura 12.	Títulos séricos de IgM na diluição de 1:20, em pacientes com a forma cutânea de <i>L. (V.) guyanensis</i> , que apresentavam evolução da doença entre 15 dias e oito meses. Valor do Cut off na diluição de 1:20: 0,004.....	51
Figura 13.	Níveis séricos de anticorpos (IgG e IgM) na diluição de 1:40 em pacientes infectados com a forma cutânea de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . Valor do Cut-off na diluição de 1:40 para IgM: 0,0019 e IgG: 0,005.....	52
Figura 14.	Níveis séricos de anticorpos (IgG e IgM) na diluição de 1:40 em pacientes infectados com a forma mucosa de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . Valor do Cut-off na diluição de 1:40 para IgM: 0,0019 e IgG: 0,005.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1..	Características dos grupos controle do teste sorológico.....	36
Tabela 2.	Origem e identificação das espécies de <i>Leishmania</i> utilizadas neste estudo.....	37
Tabela 3.	Dados demográficos, tempo de evolução e formas clínicas dos pacientes com Leishmaniose tegumentar.....	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1- Leishmaniose	16
1.2- A Leishmaniose Tegumentar Americana.....	21
1.3- Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar.....	22
1.4- Diagnóstico.....	27
1.4.1- Testes Sorológicos.....	28
1.4.1.1 Ensaio imuno enzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay –ELISA).....	28
1.5- Fisiopatogenia.....	30
2. OBJETIVOS.....	34
2.1 Geral.....	34
2.2 Específicos.....	34
3 MATERIAL E METODOLOGIA.....	37
3.1. Amostras de Soro/ Paciente.....	35
3.2. Técnicas Sorológicas.....	37
3.2.1 Preparação dos antígenos solúveis.....	37
3.2.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	38
3.2.2.1 Reação enzimática.....	38
3.2.2.2 Cálculo do limiar de reatividade (cut-off).....	38
4. RESULTADOS.....	40
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	57
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose tem despertado atenção especial quanto a sua importância médica e econômica, apresentando diferentes manifestações clínicas, dentre elas as formas visceral e tegumentar, encontrando-se a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) entre as oito doenças infecto-parasitária listada como de maior importância pela Organização Mundial de Saúde (ASHFORD, 2000). O conhecimento dos principais mecanismos de defesa imune contra os diversos agentes infecciosos permite a compreensão da patogênese das doenças infectoparasitárias e das várias estratégias do hospedeiro e do parasita. O sistema imunológico atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais moleculares e celulares (MACHADO et al., 2002).

É fundamental o entendimento de que tanto a resposta Th1 como a Th2 são importantes na defesa do hospedeiro contra as infecções. A resposta Th1 está relacionada com a defesa contra protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares (MILLS ; MCGUIRK P, 2004). Essas respostas são também antagônicas, desde que o IFN- modula negativamente a resposta Th2, e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta Th1, o que permite uma homeostasia no sistema imune e uma resposta imunológica balanceada. Adicionalmente, as células regulatórias da resposta imune que expressam moléculas e produzem interleucinas estão envolvidas em modular a resposta imune, impedindo ou diminuindo as conseqüências das reações de hipersensibilidade e das doenças auto imunes (MACHADO et al., 2002).

Na LTA, fica difícil de se estabelecer um padrão específico de resposta imune, pela complexidade da enfermidade e pelo número de espécies que causam a doença. Na leishmaniose cutânea a diferença entre resistência e susceptibilidade reside na ativação de linfócitos T

CD4+ Th1 ou Th2 (O'NEIL et al., 1993). Testes sorológicos têm sido empregados, com considerável importância, no diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos dessas enfermidades. Além disso, a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* possibilita avaliar a evolução da infecção, bem como fornecer dados sobre as características da resposta imune do indivíduo. Vários perfis e níveis de imunoglobulinas específicas anti-*Leishmania* spp. têm sido detectados em pacientes com LTA, refletindo não só a carga parasitária, como também a espécie envolvida e o tempo de infecção, além de fatores intrínsecos do próprio hospedeiro (GUTIERREZ et al., 1991).

1.1 LEISHMANIOSE

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias causadas por mais de 20 espécies de tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, cujo parasita digenético é transmitido por insetos vetores, os flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Afetam animais silvestres e domésticos (zoonose) e acometem o homem de forma acidental, o qual também pode ser considerado agente disseminador da doença (ASHFORD, 2000; MARZOCHI et al., 1999).

As leishmânias apresentam dois estágios evolutivos distintos nos hospedeiros vertebrados (roedores, edentados, canídeos e primatas, incluindo o homem) e invertebrados: i) promastigotas (com flagelo livre), que se desenvolvem no tubo digestivo do inseto e, ii) amastigotas (com flagelo rudimentar intracelular), que parasitam o Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) de animais vertebrados, multiplicando-se no interior de macrófagos por divisão binária (ARIAS; FREITAS, 1977, SOUZA et al., 1997).

As leishmanioses são endêmicas em 88 países, onde estima-se que 350 milhões de pessoas vivam em áreas de risco, totalizando uma incidência de casos anuais de 600.000 e uma prevalência de 12 milhões (WHO, 2004).

O Brasil é um dos países com maior incidência de leishmanioses, onde número de casos passou de 21.800 em 1998 para 60.000 em 2003. Esta doença é a segunda maior moléstia infecto-parasitária na Amazônia, superada apenas pela malária (SOARES; TURCO, 2003; WHO, 2004).

Conforme a forma de acometimento do homem, as leishmanioses dividem-se em dois grandes grupos: as leishmanioses dermatrópicas/mucotrópicas (tegumentares) e as leishmanioses viscerotrópicas. O primeiro denomina-se assim porque afeta principalmente a estrutura da pele e, excepcionalmente, das mucosas das vias aéreas superiores, sendo reconhecidas clinicamente três apresentações: a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucosa (LM), e a leishmaniose cutânea difusa (LCD). As formas viscerotrópicas afetam órgãos internos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea, denominado de calazar ou febre de dum-dum (CENEPI, 2000; MARZOCHI et al., 1999).

As principais manifestações da doença variam de acordo com a espécie do agente patogênico gerando diferentes aspectos clínicos, patológicos, imunológicos (WILSON; PEARSON, 1990).

No Brasil, o perfil da leishmaniose está mudando, devido à expansão humana para áreas endêmicas florestais, de uma zoonose transmitida acidentalmente ao homem, para uma doença de interface rural-urbana (OLIVEIRA-NETO et al., 1988). Nas últimas décadas, as análises epidemiológicas da LTA têm sugerido mudanças no padrão de transmissão da doença, inicialmente considerada zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com as florestas. Posteriormente, a doença começou a ocorrer em zonas rurais, já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas. Observa-se a existência de três

perfis epidemiológicos: a) silvestre (zoonose de animais silvestres, transmissão em áreas de vegetação primária); b) ocupacional ou lazer (em áreas de exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, extração de madeira, atividades agropecuárias, ecoturismo) e c) rural ou periurbana- áreas de colonização ou periurbana, áreas onde houve adaptação do vetor ao peridomicílio (MSB, 2007).

Na Amazônia, surtos epidêmicos de leishmaniose estão associados a derrubadas de matas para construção de estradas, implantação de novos núcleos residenciais, treinamento de militares, entre outros (ARAÚJO FILHO, 1981). As infecções são ocasionadas por sete espécies de leishmânias, seis do subgênero *Viannia*: *Leishmania (V.) braziliensis* VIANNA, 1911, *L. (V.) guyanensis* FLOCK, 1954, *L. (V.) lainsoni* SILVEIRA et al., 1987, *L. (V.) naiffi* LAINSON; SHAW, 1989, *L. (V.) shawi* LAINSON et al., 1989, *L. (V.) lindenbergi* SILVEIRA et al., 2002 e uma do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis* LAINSON; SHAW, 1972. A comparação entre dados clínicos da doença e os agentes etiológicos revelou que 83% dos casos notificados nesta região foram ocasionados pela *L. guyanensis* (SILVEIRA et al., 2002).

A *L.(V.) braziliensis*, apresenta distribuição em todo o território brasileiro, além de vários países da América Central e do Sul (de Belize até a Argentina), sendo provável que nem todos os casos correspondam exatamente ao mesmo parasita, mas que exista um complexo de subespécies. Existem poucas informações sobre seus hospedeiros silvestres, tendo sido relatados parasitas semelhantes em roedores (*Akodon* sp., *Proechimys* sp., *Rattus* sp., *Oryzomys* sp. e *Rhipidomys* sp.) e marsupiais (*Didelphis* sp.). Apesar de *L. (V.) braziliensis* ser encontrada em várias espécies de animais domésticos como o cão, equinos e mulas, ainda não havia sido feita a identificação de animais silvestres como reservatórios primários desta espécie, apenas suposições. Estudo realizado pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ) no município de Amaraji, situado na zona da mata de

Pernambuco, revelou que o roedor *Bolomys lasiurus* (rato-do-mato) é o reservatório primário deste parasita e o *Rattus rattus* (rato-preto) – sinantrópico ou doméstico, o reservatório secundário na região, mantendo assim o ciclo zoonótico da doença (BRANDÃO-FILHO et al., 2003). Esta espécie apresenta como vetor a *Lutzomyia wellcomei* (antropofílico, com picadas diurnas e de maior atividade nas estações de chuva), na Serra dos Carajás, além de outras espécies (*Lu. whitmani*, *Lu. migonei*, *Lu. pessoai*, *Lu. intermedia* e *Lu. carrerai*) que vêm se adaptando em áreas peridomésticas e em florestas primárias. Na transmissão peridoméstica, apresentam-se como hospedeiros: cavalos, jumentos, cães e gatos. A *L. braziliensis* acometem no homem a LC e a LM (LAINSON, 1997; SILVEIRA et al, 1997; MSB, 2000).

A *L. (V.) guyanensis* está amplamente distribuída no Brasil (Amazonas, Pará, Amapá e Roraima) ao norte do rio Amazonas e leste do rio Negro e em outros países como Guianas, Peru, Equador e Venezuela. Seus principais hospedeiros são: edentados (*Choloepus didactylus* e *Tamandua tetradactyla*), marsupiais (*Didelphis marsupialis*) e roedores (*Proechimys* sp.), sendo transmitida pelos vetores *Lu. umbratilis* (primariamente) e secundariamente pela *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* (MSB, 2000). Estes flebótomos têm a característica de repousar em troncos das árvores em terra firme após o repasto, e quando perturbados, durante o dia ou à noite, atacam em grande número, causando inúmeras lesões chamadas “pian-bois”. Causam ao homem a LC, com múltiplas lesões, e raramente lesões nas mucosas (LAINSON, 1997; SILVEIRA et al, 1997; MSB, 2000).

A *L. (V.) lainsoni*, distribui-se pela região Amazônica, encontrada no Pará e, em recente estudo, em Rondônia. Tem como hospedeiro vertebrado o roedor *Agouti paca*. A *Lu. ubiquitous* é o único vetor conhecido e de baixa antropofilia, ocasionando com pouca frequência a LC (LAINSON, 1997; SILVEIRA et al, 1997; MSB, 2000).

A *L. (V.) naiffi*, distribui-se pelo Brasil (Amazonas e Pará) e na Guiana Francesa. Tem como hospedeiro o tatu *Dasyopus novemcinctus*, sendo transmitida pela *Lu. paraensis*, *Lu. ayrozai* e *Lu. squamiventris*. Estas espécies apresentam alta antropofilia cujos hábitos zoofílicos são pouco conhecidos. Causam ao homem, principalmente a LC (LAINSON, 1997; SILVEIRA et al, 1997; MSB, 2000).

A *L. (V.) shawi*, encontrada no Estado do Pará, tem como hospedeiros os primatas (*Cebus apella* e *Chiropotes satanas*), as preguiças “real” (*Choloepus didactylus*) e “bentinha” (*Bradypus tridactylus*) e o quati (*Nasua nasua*), sendo considerado como vetor a espécie do complexo *Lu. whitmani* que tem como habitat natural os troncos de florestas primárias, atacando avidamente o homem quando perturbadas. Causam ao homem, principalmente a LC (LAINSON, 1997; SILVEIRA et al, 1997; MSB, 2000).

A *L. (V.) lindenbergi*, foi isolada de lesões cutâneas de soldados em treinamento em uma área de reserva florestal no Estado do Pará por Silveira et al. (2002). Não existem relatos de infecções em animais ou flebotomíneos. A provável espécie transmissora é a *Lu. antunesi* (MSB, 2007).

A *L. (L.) amazonensis* apresenta-se distribuída no Brasil (Amazonas, Pará, Rondônia, sudoeste do Maranhão, Bahia, Minas Gerais e Goiás), principalmente na bacia amazônica, em áreas de florestas primárias e secundárias tipo várzea e igapó e, em outros países como Colômbia, Paraguai, Bolívia e Guiana Francesa. Seu principal hospedeiro silvestre é o *Proechimys* sp. (rato-soiá), além de outros roedores (*Oryzomys* sp., *Neacomys* sp., *Nectomys* sp e *Dasyprocta* sp.); os marsupiais (*Metachirus* sp., *Philander* sp., *Didelphis* sp. e *Marmosa* sp.) e a raposa (*Velpus* sp.). Este parasito tem como principal vetor a *Lu. flaviscutellata*, uma espécie de hábito noturno e pouco antropofílica e as espécies *Lu. reducta* e *Lu. olmeca nociva*, como vetores secundários, no Amazonas e em Rondônia. É responsável

no homem pelas formas clínicas da LC, LCM e por uma forma sem tratamento conhecida por LCD anérgica (LAINSON, 1997; SILVEIRA et al, 1997; MSB, 2000).

1.2 A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A Leishmaniose Tegumentar já era conhecida como um grupo de doenças dermatológicas semelhantes entre si, e sua apresentação clínica era associada a lesões cutâneas, geralmente ulcerosas e, por vezes, com comprometimento da mucosa oronasal (PESSOA; BARRETTO, 1948).

Rabello (1923a, 1923b) criou o termo Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), denominação que abrange tanto a forma cutânea como a forma mucosa da doença. Vianna (1912, 1914) e d'UTRA; SILVA (1915) introduziram o uso do tártaro emético, antimonial trivalente, na terapêutica da LTA. Os antimoniais pentavalentes só foram sintetizados a partir da década de 20, permanecendo como a droga de eleição para o tratamento das leishmanioses (MSB, 2006).

Durante a década de 70, foi dado um novo impulso ao conhecimento da LTA na Região Amazônica, quando LAINSON e SHAW (1972), com base em critérios clínicos, epidemiológicos e biológicos, propuseram uma nova classificação das leishmânias do Novo Mundo, dividindo-as em dois grandes grupos (complexos): o complexo *L. mexicana* e o *L. braziliensis* (MSB, 2006).

Quando comparadas às taxas de incidência de LTA nas diversas regiões brasileiras, o Norte do Brasil foi a região que apresentou a maior taxa durante o período de 1993 a 2003, devido a dois padrões epidemiológicos distintos; um relacionado à expansão das fronteiras

agrícolas e outro ao crescimento de regiões periurbanas, com possível adaptação dos parasitas a reservatórios extra-silvestres (OMS, 2004).

No Estado do Amazonas, a LTA é primariamente uma zoonose em que o ciclo de transmissão ocorre entre os flebotomíneos e os animais silvestres. Na maioria das vezes, o homem se infecta ao alterar o ambiente, interpondo-se no ciclo silvestre ao penetrar nesse ecossistema (LAINSON, 1985). A doença ocorre, mais habitualmente, na forma de surtos epidemiológicos. Dessa forma, o grau de exposição dos indivíduos acometidos está relacionado diretamente a assentamentos populacionais agrícolas planejados ou mais freqüentemente oriundos de processos de ocupação na periferia da cidade, em sua maioria, desordenadas (GUERRA et al., 2001; PAES, 1998). Em decorrência, os indivíduos ficam expostos aos vetores, pois grande parte das casas em assentamentos populacionais recentes são construídas muito próximas da orla da floresta e os indivíduos são alcançados pelo raio de ação desses vetores, que chegam as casas também atraídos por diversos fatores como a luz, a presença de animais sinantrópicos como o *Didelphis marsupialis*, animais domésticos e o próprio homem. Apesar disso, a transmissão nessa área parece ser transitória, visto que, uma vez completada a urbanização, a transmissão é interrompida (ANDRADE, 2005; PAES et al., 1991; GUERRA et al., 1998).

Segundo Grimaldi et al. (1991), os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam um maior polimorfismo genético nesta região, comparado com cepas isoladas em outras áreas endêmicas. Este fenômeno pode estar correlacionado com a maior variedade de espécies de flebotomos vetores e animais reservatórios presentes na Amazônia (GRIMALDI; TESH, 1993).

A endemia associada com este patógeno incide em focos rurais e urbanos (75,9% e 24,1% dos casos, respectivamente), sendo a doença comum em jovens do sexo masculino, que trabalham no campo. Embora o encontro de lesão cutânea (90,7%), em geral ulcerada

(78%), predomine como forma clínica, o registro de casos (9,3%) com lesão mucocutânea é de interesse, pois confirma outros estudos (NAIFF et al., 1988; GRIMALDI et al., 1991).

1.2 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Variações quanto à severidade das leishmanioses vão desde uma forma benigna até múltiplas lesões cutâneas ou infecções viscerais (EDILEUZA et al., 2000). As diferentes espécies do gênero *Leishmania* produzem grande variedade de manifestações clínicas que dependem da interação entre a resposta imune do hospedeiro vertebrado e da invasibilidade, tropismo e patogenicidade deste parasito (ASHFORD et al., 1992; DESJEUX, 1996).

A forma LC é caracterizada por lesões ulcerosas, indolores, únicas ou múltiplas. O período de incubação da doença varia de 1 a 4 semanas, surgindo então, uma lesão inicial, constituída por pápula eritematosa, única ou múltipla, situada geralmente em região descoberta do tegumento, que corresponde ao ponto de inoculação pelo flebótomo. Nesta etapa, pode-se ainda encontrar linfangite e adenopatia regional. As lesões evoluem formando úlceras, as quais apresentam bordos altos, irregulares e infiltrados (aspecto em moldura de quadro), com fundo granuloso, de coloração vermelho-vivo, podendo estar coberta por exsudato seroso ou sero-purulento. No mesmo doente, podemos encontrar lesões com diferentes fases evolutivas, eventualmente sendo observado lesões satélites (lesões menores ao redor da úlcera), podendo evoluir para cicatrização espontânea ou dar origem a placas vegetantes verrucosas (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

Nos pacientes com LC, o teste cutâneo ao antígeno de *Leishmania* sp. (Teste de Montenegro) é positivo indicando que há desenvolvimento de uma resposta imune celular contra o parasita, a qual persiste após a cura da lesão (CASTES et al., 1983; SARAVIA et al., 1989). Observa-se também o desenvolvimento de uma resposta imune humoral, a qual não está associada com proteção. A resposta humoral compreende uma produção inicial de IgM,

seguida da produção de IgG1, IgG2, IgG3 e algumas vezes de IgA e IgE (RODRIGUES et al., 1996).

Alguns autores propõem uma classificação clínica baseada em critérios, como a fisiopatogenia a partir do local da picada do vetor, aspecto, localização das lesões, incluindo a infecção inaparente (testes sorológicos e IDRMs positivos, indivíduos aparentemente saudáveis, residentes em áreas de transmissão, história prévia negativa de LTA e ausência de cicatrizes cutâneas suspeitas de LTA) a leishmaniose linfonodal (ausência de lesão cutânea e linfadenopatia localizada que precede a lesão cutânea). Classicamente a doença se manifesta sob duas formas a Leishmaniose cutânea e a mucocutânea (MSB, 2007).

Marzochi (2001) e o Ministério da Saúde (2007) classificam as formas clínicas da *leishmaniose cutânea* em (Figura 1):

Forma cutânea localizada: Representa o acometimento primário da pele. A lesão é geralmente do tipo úlcera, com tendência à cura espontânea e apresentando boa resposta ao tratamento, podendo ser única ou múltipla. Na Região Norte, as lesões múltiplas são freqüentemente causadas por *L. (V.) guyanensis* e parecem estar relacionadas às múltiplas picadas de *Lu. umbratilis*. A forma localizada pode acompanhar-se de linfadenopatia regional e de linfangite nodular e costuma apresentar Intradermoreação de Montenegro (IDRM) positiva.

Forma cutânea disseminada: É uma expressão relativamente rara que pode ser observada em até 2% dos casos. As duas espécies reconhecidas como causadoras desta infecção são a *Leishmania (V.) braziliensis* e a *Leishmania (L.) amazonensis*. Esta forma de apresentação é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares (geralmente mais do que 10 lesões cutâneas) e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com freqüência a face e o tronco. São encontrados poucos parasitas nestas lesões, além de títulos elevados de anticorpos séricos anti-*Leishmania* e resposta

variável na Intradermorreação de Montenegro. Outros aspectos a serem destacados nesta forma clínica são: o acometimento de mucosa concomitante, observado em até 30% dos pacientes e as manifestações sistêmicas, como febre, mal-estar geral, dores musculares, emagrecimento, anorexia, entre outros (MSB, 2007).

Forma recidiva cútis: caracteriza-se por evoluir com cicatrização espontânea ou medicamentosa da úlcera, com reativação localizada geralmente na borda da lesão. A resposta à terapêutica é pobre ou ausente e geralmente a Intradermo Reação de Montenegro (IDRM) apresenta-se positiva (MSB, 2007).

Forma cutânea difusa: no Brasil, a doença é causada pela *L. (L.) amazonensis*. Constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento; evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrimdo grandes extensões cutâneas. A resposta à terapêutica é pobre ou ausente e geralmente a IDRM apresenta-se negativa (MSB, 2007).

A forma *clínica mucosa ou mucocutânea* é conhecida como espúndia, nariz de tapir ou de anta. Nesta forma, a principal característica é o comprometimento da mucosa nasal que pode se estender por todo trato respiratório superior (MARSDEN, 1986). O agente etiológico é a *L.(V.) braziliensis* estando a *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) guyanensis* raramente associada a esta manifestação (BARRAL et al., 1991). No Brasil, a forma mucosa ocorre em 3% a 5% dos pacientes infectados por *L.(V.) braziliensis*; destes, cerca de 1% pode evoluir para óbito (MSB, 2006).

Um dos aspectos mais típicos da doença causada pela *L.(V.) braziliensis* é a frequência com que os parasitas produzem, meses ou anos após a lesão inicial primária, lesões destrutivas secundárias envolvendo mucosas e cartilagens. Estas lesões secundárias podem

ocorrer por extensão direta de uma lesão primária ou através da disseminação hematogênica. Cerca de 70% dos casos com lesão de mucosa aparecem dentro dos primeiros cinco anos.

Carvalho et al., (1985) sugerem que a natureza crônica e destrutiva da doença pode ser em consequência a uma intensa resposta mediada por células aos antígenos de *Leishmania*. Os pacientes com LCM também apresentam resposta positiva aos testes de Montenegro, porém com difícil confirmação parasitológica devido à escassez parasitária, e por apresentar difícil resposta terapêutica (SOUSA- ATTA et al, 2002).

Segundo Marzochi (2001) e o Ministério da Saúde (2007) a *leishmaniose mucosa* apresenta-se sob as seguintes formas clínicas:

Forma mucosa tardia: é a forma mais comum. Pode surgir até vários anos após a cicatrização da forma cutânea. Classicamente está associada às lesões cutâneas múltiplas ou de longa duração, às curas espontâneas ou aos tratamentos insuficientes da LC.

Forma mucosa de origem indeterminada: quando a LM apresenta-se clinicamente isolada não sendo possível detectar nenhuma outra evidência de LC prévia. Tais formas estariam provavelmente associadas às infecções subclínicas ou lesões pequenas, não ulceradas, de evolução rápida e que teriam passado despercebidas sem deixar cicatrizes perceptíveis.

Forma mucosa concomitante: quando a lesão mucosa ocorre a distância, porém ao mesmo tempo que a lesão cutânea ativa (não contígua aos orifícios naturais).

Forma mucosa contígua: ocorre por propagação direta de lesão cutânea, localizada próxima a orifícios naturais, para a mucosa das vias aerodigestivas. A lesão cutânea poderá encontrar-se em atividade ou cicatrizada na ocasião do diagnóstico.

Forma mucosa primária: ocorre eventualmente pela picada do vetor na mucosa ou semimucosa de lábios e genitais.

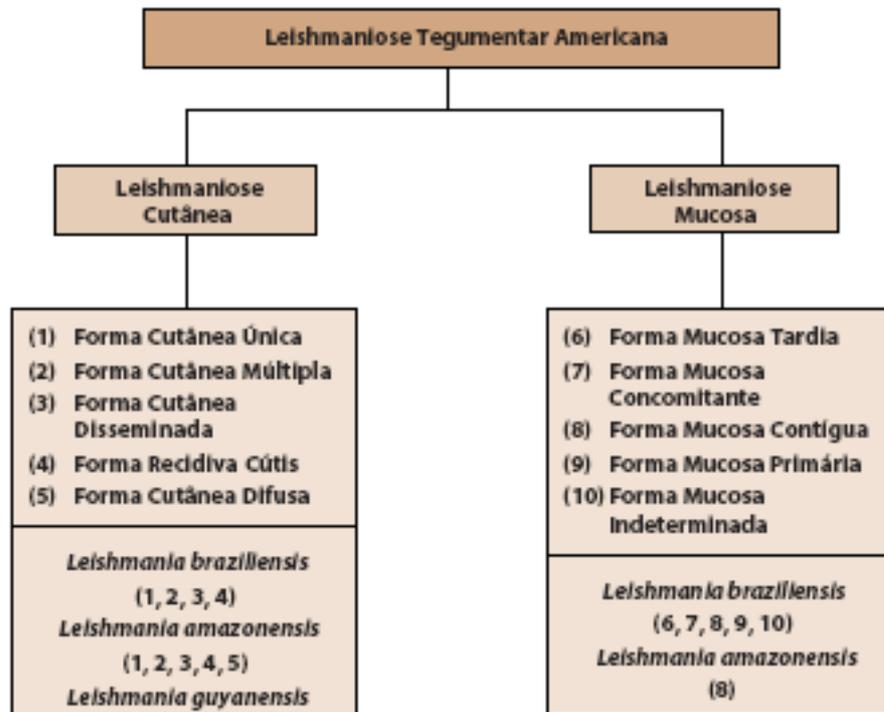


Figura 1. Formas clínicas das Leishmanioses no Brasil (Marzochi, 2001; MSB, 2007).

1.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico das leishmanioses abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais que incluem pesquisas parasitológicas e/ou imunológicas (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

O diagnóstico clínico da doença baseia-se nas características da lesão, associada à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância. Além da procura direta do parasita em raspado da lesão cutânea, a observação do agente etiológico pode ser obtida por diferentes métodos laboratoriais, tais como cultura, inoculação em hamster e exame histopatológico (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A confirmação do diagnóstico requer a identificação do patógeno ou de seus produtos nos tecidos ou fluidos biológicos do hospedeiro. Porém, nem sempre isso é possível, quer pela ausência do agente infeccioso, quer pela falta de sensibilidade dos métodos utilizados ou por falhas técnicas. Para suprir as deficiências das técnicas parasitológicas, os

métodos imunológicos diretos ou indiretos têm sido amplamente utilizados na pesquisa de antígenos, anticorpos ou imunocomplexos, devido a sua rapidez, simplicidade de execução, possibilidade de automação a baixo custo operacional (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

Em infecções causadas por leishmânias, indivíduos humanos desenvolvem anticorpos específicos que constituem a base do sorodiagnóstico refletindo não só a carga parasitária, mas também a espécie envolvida, o tempo de infecção e fatores intrínsecos do próprio hospedeiro (GUTIERREZ et al., 1991).

O diagnóstico soro-imunológico para detecção de anticorpos nos soros de pacientes pode ser dividido em dois grupos: testes que utilizam antígenos íntegros (parasitas inteiros) pela IFI (imunofluorescência indireta) e o teste de aglutinação direta (TAD) e os testes que utilizam extratos solúveis ou frações antigênicas específicas na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* no sangue periférico (soro ou plasma). Para isso as técnicas mais utilizadas são: contraimuno eletroforese (CIE), ELISA e o Western blotting (SANTOS- GOMES et al., 2000).

O exame diagnóstico ideal é aquele que, quando positivo, indica com certeza a presença da doença e, quando negativo, indica a ausência da mesma. Em outras palavras, pode ser dito que a sensibilidade de um teste é a capacidade do mesmo de reconhecer os verdadeiro-positivos e a especificidade é o poder de distinguir os verdadeiro-negativos (ALMEIDA; ROUQUAYROL, 1990).

Na forma visceral, a resposta sorológica é positiva na maioria dos casos. Mary et al., (1992) verificaram que anticorpos específicos da infecção humana causada por *Leishmania* podiam ser caracterizados através do Western blotting, quando estes não eram detectados através dos clássicos testes sorológicos (ELISA e IFI). Desta forma, os testes sorológicos têm sido empregados com considerável importância no diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos dessa enfermidade. Além disso, a análise de anticorpos anti-

Leishmania permite avaliar o curso evolutivo da infecção, bem como, fornecer dados sobre as características de sua resposta imune (BADARÓ; REED, 2001).

1.4.1- TESTES SOROLÓGICOS

1.4.1.1 Ensaio imuno enzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA)

O ELISA é um método quantitativo em que a reação antígeno-anticorpo é monitorada por medida da atividade enzimática. Desde que foram introduzidos em 1971 no diagnóstico sorológico, vêm sendo avaliados para detecção de anticorpos específicos na leishmaniose (BADARÓ; REED, 2001).

O termo ELISA foi utilizado pela primeira vez por Engvall e Perlman em 1971. Seu princípio básico é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida (em placas de poliestireno), enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica do anticorpo (SANCHES, 2001). O teste detecta quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos, podendo ter elevada precisão se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados.

Os critérios de positividade nos testes de ELISA dependem do limiar de reatividade ou “cut-off” que deve ser fixado para cada teste, dispensando muitas vezes diluições sucessivas de soros. Os antígenos utilizados são de importância crucial para definição da especificidade do teste, como por exemplo, os antígenos específicos 119kD, 123kD, HSP70, 42kD, GP63, rK26. Estes novos antígenos nos sistemas enzimáticos fazem parte destes testes

como instrumentos mais eficientes no diagnóstico sorológico das leishmanioses (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

Atualmente, os microtestes (micro-ELISA) são os mais empregados nos diagnósticos sorológicos de anticorpos de LTA, com emprego de antígenos na forma de extrato protéico e apresentando uma sensibilidade de 70,6,% superior às das demais técnicas sorológicas, especificidade de 73,2% e uma precisão de 72,7% (SANTOS- GOMES et al., 2000).

Segundo Ferreira e Ávila (2001), o ELISA tem sido empregado amplamente para a pesquisa de anticorpos, apresentando como vantagens a possibilidade de utilizar um único conjugado em diferentes sistemas e conjugados classe-específicos para a determinação de anticorpos de diferentes classes. Este método apresenta também características de elevada sensibilidade e especificidade técnica, objetividade de leitura e possibilidade de adaptação a diferentes graus de automação.

1.5- FISIOPATOGENIA

A transmissão da *Leishmania* ocorre quando formas promastigotas metacíclicas (infectantes) são inoculadas no hospedeiro vertebrado pela fêmea do inseto vetor, durante o repasto sanguíneo (MOLL, 1996).

As leishmânias são suscetíveis à ação de neutrófilos, células com grande potencial de produzir H₂O₂ (Peróxido de Hidrogênio) e NO (Óxido de Nitrogênio). Mas, ao penetrarem no hospedeiro e infectarem os macrófagos, livram-se dos ataques dos neutrófilos (TRUJILLO et al., 1999; SOUZA et al., 2005).

A fagocitose das leishmânias requer sua aderência à membrana dos macrófagos, por meio da interação entre as lecitinas destes fagocitários e os receptores CR3 de glicoproteínas e

açúcares de superfície, como a GP63 (glicoproteína de 63 KDa) e o LPG (lipofosfoglicose) presentes na membrana do parasito (FERREIRA; ÁVILA, 2001; OMS, 1990).

Uma vez os parasitos interiorizados nos macrófagos, os antígenos que foram processados e apresentados às células T também determinarão uma resposta do tipo Th1 ou Th2, dependendo da espécie de leishmânia e da suscetibilidade do hospedeiro. Portanto, um perfil de citocinas Th1, com produção de IL-2, IFN- γ e IL-12, presentes em quantidades suficientes, pode regular a resposta imune, ativar os macrófagos e controlar ainda a nível de pele a infecção (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

Quando a produção de IL-4 e IL-10 (citocinas tipo Th2) for excessiva, observa-se uma baixa ativação macrofágica e, conseqüentemente, o aparecimento das formas clínicas da doença. Uma característica comum é encontrada nas diferentes variedades clínicas da LTA, o acúmulo temporário de células do SFM (hiperplasia) nos tecidos invadidos. As espécies de leishmânias dermatrópicas levam inicialmente a produção de um histiocitoma na pele, ao contrário das viscerotrópicas que provocam hiperplasia das células do SFM dos órgãos afetados (OMS, 1990; FERREIRA; ÁVILA, 2001).

As infecções por *Leishmania* são caracterizadas pela habilidade que têm estes parasitas para escapar da destruição extracelular e penetrar em células fagocíticas, onde vão resistir ao seu poder antimicrobiano, persistindo mesmo na presença de resposta imune celular do hospedeiro (BOGDAN et al., 1996; CUNNINGHAM, 2002; ROGERS et al., 2002).

Há um consenso geral de que as células T e a imunidade mediada por células contribuem para a patogênese das diferentes formas de LTA (TRUJILLO et al., 1999).

Na leishmaniose humana, o papel da resposta imune celular mediadas por Th1 demonstra envolvimento principalmente na eliminação de patógenos intracelulares e nas respostas imunológicas. Por outro lado, os linfócitos Th2 estão envolvidos na indução da resposta humoral e nos fenômenos de eosinofilia. As características diferentes das sub-

populações Th1 e Th2 implicam em funções diferentes no curso da elaboração da resposta imune (KEMP, 1997; BOGDAN;ROLLINGHOFF, 1998)

As células Th1 produzem fundamentalmente citocinas ativadoras da imunidade mediada por células, tais como, o INF- γ , INF α , a IL-2 e IL12 e está relacionada ao controle da infecção (COFFMAN; CARTY, 1986; COFFMAN et al, 1988). Por outro lado, a susceptibilidade à infecção está relacionada à resposta de células Th2, que secretam citocinas do tipo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

Estas sub-populações também induzem a síntese de anticorpos de isotipos diferentes em todas as manifestações clínicas da LTA (TRUJILLO et al., 1999).

As células Th1 induzem respostas de anticorpos dominadas pelo isotipo IgG2, enquanto as células Th2 favorecem a síntese de isotipos IgG1, IgE e IgA (COFFMAN; CARTY, 1986; COFFMAN et al, 1988). Para ATTA AM et al., (1998) há uma provável correlação positiva entre os altos índices de IgE e a reação de Montenegro, sugerindo que estes anticorpos participam do processo de imunorregulação na leishmaniose cutânea. Além disso, a detecção de anticorpos IgE específicos na leishmaniose visceral tem sido correlacionada com a fase ativa da doença (PINHEIRO, 2004).

Em todas as formas clínicas da LTA, a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, aceita-se que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* esteja relacionada com o nível de expansão de células Th1 ou Th2. Assim como a intensidade da resposta humoral está relacionada com a carga parasitária e com a cronicidade da infecção (PIRMEZ et al., 1993; BACELLAR et al., 2002; TRUJILLO et al., 1999).

Pacientes que contraem a *forma cutânea localizada* apresentam lesões com poucos parasitos, tendendo para cura espontânea. Desenvolvem uma resposta do tipo Th1, com

citocinas IFN- γ e IL-12, com predominância de isotipos IgG1, IgG2, IgG3 (O'NEIL et al., 1993; da-CRUZ et al., 2002., SOUSA-ATTA et al., 2002).

A leishmaniose *cutânea disseminada* manifesta resposta imunológica variada, tanto há uma forte resposta de células T como uma ausência de imunidade celular (CARVALHO et al., 1994). Indivíduos com Leishmaniose cutânea difusa apresentam perfil Th2, com presença de IgG4 e elevados níveis de IL-4 (CÁCERES –DITTMAR et al., 1993, BONFIM et al., 1996).

A LCM apresenta uma elevada resposta por células T específicas, tanto Th1 como Th2, sendo direcionada para uma resposta Th1. Esta resposta exacerbada está associada a uma crônica e severa destruição tecidual, em razão de uma forte resposta inflamatória e à escassez de parasitas nas lesões. (MARSDEN, 1986; BACELLAR et al., 2002; MATOS et al., 2005. a resposta do tipo Th1 é fracamente regulada por IL-10 e TGF- β , encontradas em níveis diminuídos, mostrando que uma resposta inadequada do tipo Th1, considerada protetora na maioria da forma dessas doenças, pode levar a uma imunopatogênese exacerbada (BACELLAR et al., 2002; AMATO et al., 2003).

A LM também está associada a elevados títulos de anticorpos circulantes, como IgG1 e, principalmente IgG3 (RODRIGUEZ et al., 1996; JUNQUEIRA PEDRAS et al., 2003).

Assim como as formas clínicas, espécies diferentes também induzem a respostas diferentes. Matta et al. (2005), verificaram diferenças na resposta imune em pacientes infectados por *L.(V.) guyanensis* e *L.(V.) braziliensis*.

Pacientes com infecções causadas por *L.(V.) guyanensis* demonstraram reduzido ou não detectável reconhecimento de antígenos homólogos pelas células T, associadas aos altos níveis das citocinas IL-10 e IL-5, com baixos títulos de anticorpos.

Em 2005, Romero et al., demonstraram que a infecção por *L(V.) guyanensis* induz a uma resposta imune humoral bem mais reduzida do que por *L. braziliensis*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Detectar os níveis séricos de isotipos de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA e IgE) em amostras de soros de pacientes infectados com Leishmaniose cutânea e mucosa causadas por *Leishmaniose (Viannia) guyanensis*, provenientes do município de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil.

2.2 Específicos

2.2.1 Detectar os níveis séricos de isotipos de imunoglobulinas para espécie de *L. (L.) guyanensis* em pacientes com quadro clínico confirmado de LTA;

2.2.2 A partir dos resultados obtidos, comparar os títulos de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA e IgE) detectados nos soros humanos, correlacionando a espécie, formas clínicas e fase da doença (aguda/crônica) de cada amostra testada;

2.2.3 Verificar se existe correlação da presença de níveis séricos de IgE com os resultados de enduração obtidos previamente, pelas reações intradérmicas (Intradermoreação de Montenegro/IDRM) e o número de lesões cutâneas nas diferentes formas clínicas da leishmaniose e espécies de leishmânias envolvidas na infecção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE SORO/PACIENTE

Foram utilizadas 36 amostras de soros de pacientes com diagnóstico - clínico, biológico e molecular, confirmados para LTA com *L. (V.) guyanensis*, assim como, 14 amostras de soros controles provenientes de voluntários sem qualquer informação de desenvolvimento da doença (controle negativo), embora de área endêmica e alguns (CTN6, CTN9, CTN14) já terem realizado intradermoreação de Montenegro a cerca de 10 anos atrás com resultados negativos. As amostras de soros foram cedidas pela soroteca do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, INPA, Amazonas - Brasil. Todas as amostras de soro foram coletadas no período de novembro de 1985 a março de 1996 e manipuladas de acordo com normas de biossegurança (COSTA, 2000) e seguindo as normas do comitê de ética para a realização de pesquisas em humanos (Processo aprovado no. 042/2006 CEP-INPA).

Na tabela 3 encontram-se discriminadas informações individuais quanto aos dados demográficos, tempo de evolução e formas clínicas dos pacientes com Leishmaniose Tegumentar utilizados neste estudo.

As amostras de soros foram divididas em grupos caracterizados como:

1. *Experimentais:*

1.a. Amostra de soro de pacientes com diferentes formas clínicas da LTA (LC, LMC);

1.b. Amostras de soros de pacientes nos quais foram feitos teste intradérmico;

1.c. Amostras de soros de pacientes nos quais não foram feito teste intradérmico;

2. *Controles* (Tabela 1):

Controles negativos:

2.a. Voluntários sem antecedentes de nenhum tipo de lesão cutânea ocasionada por Leishmaniose sem teste de Montenegro;

2.b. Voluntários sem antecedentes de nenhum tipo de lesão cutânea ocasionada por Leishmaniose com teste de Montenegro negativo;

Controles positivos:

2.c. Amostras de soros de pacientes com lesões diagnosticadas como Leishmaniose cutânea com cura espontânea ou por tratamento e teste de Montenegro positivo;

Tabela 1. Características dos grupos controle do teste sorológico.

Nº registro grupo controle	Idade (anos)	Sexo	Logradouro	Ocupação	OBS.
Controles negativos					
- Grupo 1					
CTN1	22	F	Zona Oeste	Estudante de veterinária	*
CTN2	43	F	Zona Norte	Técnica de laboratório	*
CTN3	36	F	Zona Norte	Técnica de laboratório	
CTN4	36	F	Zona Sul	Serviços gerais	
CTN5	45	F	Zona	Pesquisadora	*
CTN6	21	M	Zona Oeste	Estudante	
CTN7	25	M	Zona Leste	Estudante	
CTN8	45	M	Zona Norte	Técnico de Laboratório	*
CTN9	54	F	Zona Leste	Pesquisadora	
CTN10	23	F	Zona Sul	Farmacêutica	
CTN11	54	M	Zona Sul	Professora	
CTN12	54	M	Zona Sul	Técnico de Laboratório	*
- Grupo 2					
CTN13	50	M	Zona Leste	Técnico de Laboratório	campo
CTN14	56	M	Zona Leste	Técnico de Laboratório	campo
Controle Positivo					
MHOM/BR/95/IM4103	36	F	Zona Norte	Doméstica	
MHOM/BR/95/IM4106	36	F	BR174	Industriário	
MHOM/BR/95/IM4203	26	M	Reserva Ducke	Caminhoneiro	
MHOM/BR/95/IM4231	16	M	AM010	Jardineiro	
MHOM/BR/95/IM4256	20	F	AM010	Estudante	

Grupo 1: Indivíduo negativo para Leishmaniose Tegumentar Americana sem ter realizado teste de IDR; Grupo 2: Indivíduo negativo para Leishmaniose Tegumentar Americana com teste de IDR negativo; * Indivíduos com provável contato com o parasita devido sua ocupação profissional; M: sexo masculino; F: Sexo feminino.

3.2. TÉCNICAS SOROLÓGICAS

3.2.1 Preparação dos antígenos solúveis:

Os antígenos utilizados na pesquisa foram obtidos das formas promastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) braziliensis* (Tabela 2), cultivadas em meio RPMI (SIGMA- 1640), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFBi) [Cultilab, Campinas, BR], 1% de antibiótico (200U/mL de penicilina e 200 µg/mL de estreptomicina) e 1% de L-glutamina (Gibco BRL-Life Technologies, New York, USA) a 25°C até atingirem a fase estacionária. Os parasitas (10^9) foram colhidos, lavados por centrifugação em solução salina tamponada com fosfato (PBS pH 7,3). O precipitado final foi suspenso em tampão de lise (solução contendo EDTA 0.2M pH 8.0; Tris 1.0M pH 7.3; NaCl 2.0M e água tridestilada q.s.p.) contendo inibidores de protease (Iodoacetamina 1mM, O-fenantrolina 1mM e Fluoreto fenil-metil-sulfonil - PMSF 1mM). Em seguida, os parasitas foram submetidos a três ciclos de congelamento (N_2 líquido-196°C)/descongelamento (banho-maria, 37°C). O lisado foi centrifugado a 39500g por 10 minutos. O sobrenadante foi colhido, a concentração protéica determinada pelo método de Bradford (1976) e estocado a -20°C até o momento do uso.

Tabela 2. Origem e identificação das espécies de *Leishmania* utilizadas neste estudo.

Designação*	Espécies	Origem Geográfica
MHOM/BR/75/IM4147	<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	Pará, Brasil
MHOM/BR/75/IM2903	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Pará, Brasil
MHOM/BR/00/IM2773	<i>L. (V.) naiffi</i>	Amazonas, Brasil
MHOM/BR/77/LTB0016	<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	Bahia, Brasil

*Designação original: Hospedeiro [M=Mammalia; . HOM=Homo sapiens/país de origem/ano de isolamento/código original.

3.2.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.2.2.1 Reação enzimática:

Placas de poliestireno (Nunc Denmark, Maxi Sorp), com 96 poços foram sensibilizadas com 2,5µg/mL de antígeno em 100µL/poço de Tampão Carbonato (pH 9,6), sendo incubadas por 18 horas a 4°C em câmara úmida e, em seguida lavadas quatro vezes com Solução de Lavagem (ST) contendo 0,05% de Tween-20 e 0,9% de NaCl. Posteriormente os sítios remanescentes das placas foram bloqueados com 150µL/poço com Tampão de Bloqueio contendo com 2% de leite Mólico desnatado e incubadas durante 30 minutos a 37°C em câmara úmida, sofrendo quatro lavagens posteriores com ST. As amostras de soro foram adicionadas (100µL/poço, em duplicata) nas diluições de 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 em Tampão de incubação (PBSCT) contendo 0,05% de Tween 20 e 0,25% de Leite Mólico desnatado. Após incubação por 30 minutos a 37°C, as placas foram lavadas e nelas adicionado o conjugado imunoenzimático (anticorpos policlonais SIGMA) anti-IgG (A-0293), IgM (A-0420), IgE (A-9667) ou IgA (A-0295) humana produzidos em cabra, ligados à peroxidase, na diluição de 1:40.000, 1:50.000; 1: 10.000 e 1:5.000 em PBSCT respectivamente, no volume de 50µL/poço, sendo posteriormente incubadas por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas novamente, sendo adicionado o substrato enzimático contendo orto-fenilenodiamina (OPD) [SIGMA P5412-100TAB] em tampão Citrato de Sódio/acido cítrico, pH 5 e 4µL de H₂O₂, (50uL/poço). Após o desenvolvimento da cor por 15 minutos, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 4N e a leitura efetuada em leitor de microplaca (BIO TEK) a 492nm.

3.2.2.2 Cálculo do limiar de reatividade (“cut-off”)

O “cut-off”, ou limiar de reatividade, definido com a técnica de ELISA, foi determinado a partir dos resultados obtidos com as amostras de soros humanos comprovadamente negativos em comparação aos de resultados positivos. Os ensaios de ELISA foram feitos em duplicata e em diferentes dias, para comprovar a reprodutibilidade dos resultados. Foi utilizado o cálculo de média da DO de no mínimo 10 amostras de soros negativos, somado a duas vezes o desvio padrão. Acima dos valores calculados foi considerado como positivo. Assim, baseado na distribuição das frequências dos títulos definimos, para cada antígeno utilizado, o valor limite considerado como positivo nos testes.

4. RESULTADOS

Neste estudo foram avaliados os resultados obtidos quanto à análise clínica, parasitológica e imunológica de 36 pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *L. (V.) guyanensis*. Deste total analisado, 33 apresentavam a forma cutânea e três com a forma mucocutânea contígua (Tabela 3).

Dos 36 pacientes com *L. (V.) guyanensis*, sete (19,44%) eram do sexo feminino e 29 (80,56%) do sexo masculino (Figura 2).

Figura 2. Percentual de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por *Leishmania (Viannia) guyanensis* agrupados por sexo.

Do total de casos de LTA por *L. (V.) guyanensis*, 91,6% (33/36) apresentavam a forma cutânea e 8,4% (3/36) a forma mucosa contígua. Dos 33 pacientes que apresentavam leishmaniose cutânea, 29 (29/33, 87,87%) tinham lesões com tempo de evolução entre 15 e 90 dias e quatro (4/33, 12,12%) entre 120 e 240 dias.

Quanto à forma cutânea 21,21% (7/33) eram do sexo feminino e 78,78% (26/33) masculino. Os casos de LTA foram também agrupados pela faixa etária de acordo com a classificação segundo a Secretaria de Assistência a Saúde (MSB, 1993).

Tabela 3. Dados demográficos, tempo de evolução e formas clínicas dos pacientes com Leishmaniose Tegumentar.

No. registro da amostra/código OMS*	IDADE	SEXO	IDRM (mm)	Forma clínica	Registro por área de Transmissão	Área de provável infecção (Manaus, AM)	Tempo lesão (meses)
MHOM/BR/89/IM3597	7	F	10,0 x 10,8	Mu	7	AM010 km 77	12
MHOM/BR/93/IM3991	33	M	46,0 x 60,2	Mu	19	BR174 km145	8
MHOM/BR/95/IM4094	23	M	4,0 x 4,0	Mu		Rio Javarim	12
MHOM/BR/95/IM4190	20	M	-	C	3	AM010 km42	4
MHOM/BR/95/IM4207	26	F	7,0 x 8,0	C	5	Reserva Ducke 26km	0,5
MHOM/BR/95/IM4139	44	M	-	C	15	BR174 ZF3 km42	0,5
MHOM/BR/94/IM4017	38	M	28,0 x 28,0	C	13	BR174 ZF2 km23	1
MHOM/BR/95/IM4106	36	F	11,0 x 12,5	C	13	BR174 km23	1
MHOM/BR/95/IM4203	26	M	10,8 x 10,8	C	5	Reserva Ducke km26	1
MHOM/BR/95/IM 4217	23	M	9,5 x 9,5	C	17	BR174 km100	1
MHOM/BR/95/IM4231	16	M	8,8 x 8,8	C	7	AM010 km77	1
MHOM/BR/95/IM 4213	26	M	-	C	4	Sta Etelvina- Manaus	1
MHOM/BR/95/IM 4225	26	M	-	C	4	Monte Sião- Manaus	1
MHOM/BR/95/IM 4227	21	M	-	C	3	JorgeTexeira Manaus	1
MHOM/BR/96/IM4248	20	M	-	C	1	Japiim- Manaus	1
MHOM/BR/05/IM5292	30	F	-	C	2	S. Jorge- Manaus	1
MHOM/BR/95/IM4216	30	M	-	C	14	BR174 km36	1,5
MHOM/BR/95/IM4115	30	M	-	C	5	Reserva Ducke km26	1,5
MHOM/BR/95/IM4135	38	M	9,5 x 10,3	C	15	BR147 m 42	1,5
MHOM/BR/95/IM4219	23	M	9,1 x 9,1	C	7	AM010 km77	1,5
MHOM/BR/95/IM4222	52	F	7,0 x 10,3	C	4	AM010 km47	1,5
MHOM/BR/95/IM4224	17	M	8,0 x 9,1	C	3	AM010 km42	1,5
MHOM/BR/95/IM4114	40	M	6,0 x 7,5	C	5	Reserva Ducke Km26	2
MHOM/BR/95/IM4145	19	M	5,0 x 5,0	C		Janauacá	2
MHOM/BR/96/IM4256	20	F	6,8 x 7,6	C	5	AM010 km60	2
MHOM/BR/95/IM4110	14	M	-	C	3	AM 010 km 42	2
MHOM/BR/95/IM4152	21	M	-	C	2	AM010 km30 R4	2
MHOM/BR/95/IM4186	29	M	-	C	3	JorgeTexeira Manaus	2
MHOM/BR/95/IM4212	38	M	-	C	2	BR174 km39	3
MHOM/BR/95/IM4103	36	F	25,0 x 31,0	C	4	Sta Etelvina Manaus	3
MHOM/BR/95/IM4107	20	M	33,0 x 62,5	C	18	BR174 km126	3
MHOM/BR/95/IM4198	17	M	7,5 x 7,5	C	5	Reserva Ducke km26	3
MHOM/BR/95/IM4228	36	M	8,0 x 12,0	C	3	JorgeTexeira Manaus	3
MHOM/BR/95/IM4108	25	M	10,0 x 10,0	C	1	AM 010 km 20	5
MHOM/BR/95/IM4143	17	M	-	C	6	AM010 km68	5
MHOM/BR/95/IM4147	27	M	11,5 x 11,5	C	16	BR174 km70	8

*Código da OMS (Organização Mundial de Saúde). Designação original: Hospedeiro (M=Mammalia; HOM=*Homo sapiens*/país de origem/ano de isolamento/código original). (-): Não foi realizada a IDRMM; M: sexo masculino; F: sexo feminino; Mu: forma mucosa contígua; C: forma cutânea;

Do total de casos de LTA em indivíduos do sexo feminino, foi descrito um caso (14,29% - 1/7) em criança (1-12 anos) com idade de sete anos e 85,71% (6/7) na faixa etária adulta (20-59 anos). Do total de indivíduos do sexo masculino, verificou-se um caso (3,4% - 1/26) em pré-adolescente com 14 anos de idade; 17,24% (5/26) na faixa etária adolescente (15-19 anos) e 79,32% (23/26) em adultos (Figura 3).

Figura 3. Percentual de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana causado por *Leishmania (Viannia) guyanensis* de acordo com sexo, faixa etária e forma clínica.

Quanto ao total de casos de LTA por *L. (V.) guyanensis* (diagnosticados no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, no período de novembro de 1985 a março de 1996), distribuídos por faixa etária (MSB, 1993) independente da forma clínica e sexo, verificou-se maior ocorrência na faixa etária adulta com 80,55% (29/36), considerada a mais produtiva (Figura 4).

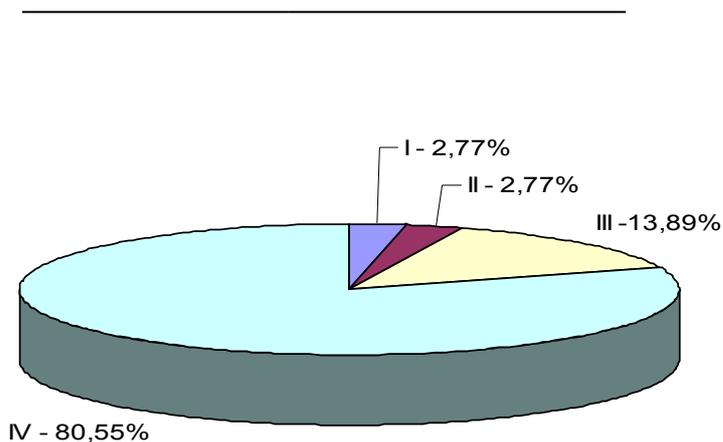


Figura 4. Distribuição em percentual dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana diagnosticados no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, no período de novembro de 1985 a março de 1996 por faixa etária segundo o Ministério da Saúde (1993). Faixa I (criança): 1-12 anos; Faixa II (pré-adolescente): 12 a 15 anos; Faixa III (adolescente): 15 a 19 anos; Faixa IV (adulto): 20-59 anos e Faixa V (maduro): mais de 60 anos.

Todos os pacientes com a forma cutânea que fizeram exame direto por escarificação tiveram resultado positivo, sendo que 36,36% (12/33) apresentavam lesão única; 54,54% (18/33) com duas a nove lesões e 9,1% (3/33) com mais de 10 lesões, sendo 19 o número máximo de lesões apresentadas por paciente no grupo estudado. Todos os três casos de lesões mucosas foram também positivos ao exame direto em impressão de lâmina corada pelo método de Giemsa e apresentaram lesões cutâneas (um, três e 11 anos) antes de desenvolverem a forma mucosa.

Os 57,57% pacientes, com a forma cutânea de *L. (V.) guyanensis* que fizeram a IDR, apresentavam lesão cutânea e tiveram reação positiva com resultados de enduração variando de 5,0 x 5,0 mm e 33,0 x 62,5 mm. Pacientes altamente reativos na IDR (acima de 15 mm de enduração) apresentaram lesões múltiplas e a detecção de parasitas ao exame direto foi dificultosa (MHOM/BR/94/IM4017, 28x28mm; MHOM/BR/95/IM4103,25x31mm; MHOM/BR/95/IM4107, 33x62,5mm).

36 pacientes infectados por *L. guyanensis*, de acordo com o histórico individual, é sugestivo que a transmissão da doença tenha ocorrido em áreas com características rurais (Figura 5), distribuídas ao longo das rodovias AM010, BR174 e áreas de reserva (Reserva Ducke).

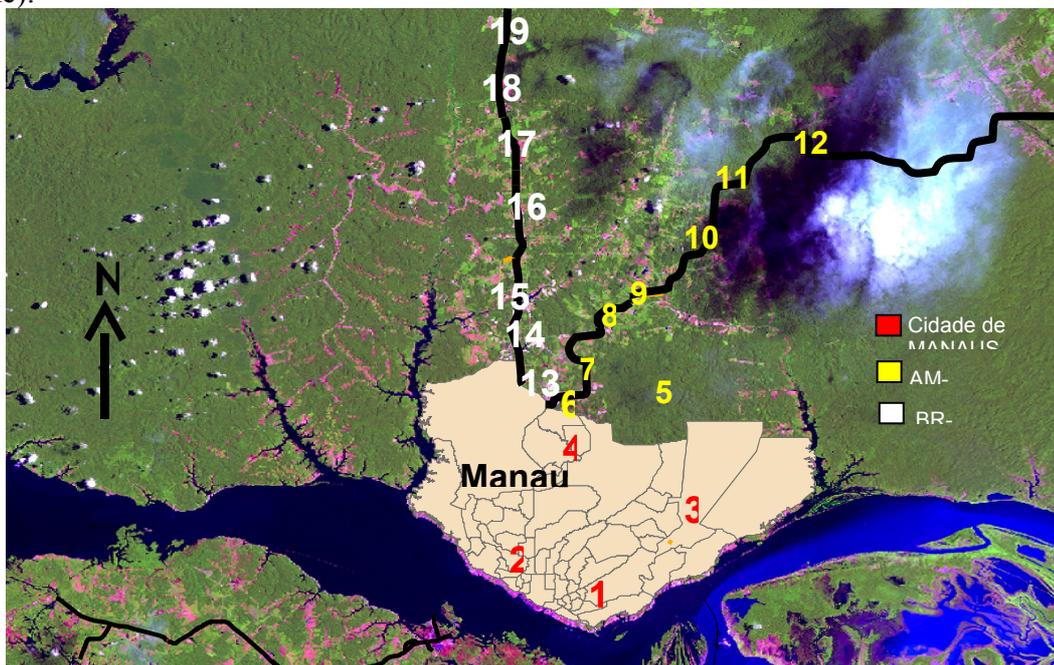


Figura 5. Mapa do município de Manaus com casos de *Leishmania (Viannia) guyanensis* distribuídos por localidade. As legendas representadas por números encontram-se discriminadas na tabela 4 e foram agrupadas de acordo com as áreas de transmissão (zonas da cidade de Manaus, Rodovias AM010 e BR174). Mapa do Google earth/Landsat.

Quanto a ocorrência de casos de LTA em relação a profissão/ocupação/atividade verificou-se um maior número de casos em estudantes, pedreiros e técnicos de laboratório, procedentes de áreas rurais de Manaus, principalmente de moradores das estradas AM-010 e BR-174 (Figura 6).

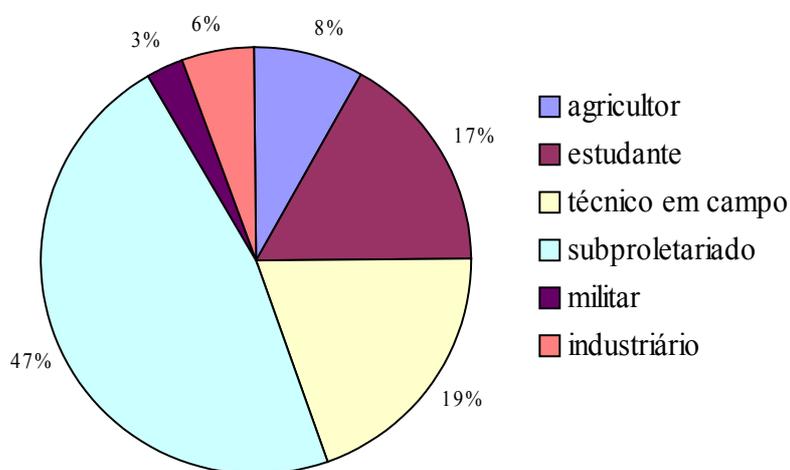


Figura 6. Distribuição de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana quanto a profissão/ocupação/atividade.

1. Estudo de casos de três pacientes com Leishmaniose mucosa contígua causadas por L. (V.) guyanensis (MARZOCHI, 2001; NAIFF, 1998).

Dentre os três pacientes que apresentaram lesão mucosa, um (MHOM/BR/95/IM4094) com co-infecção com HIV não apresentou reatividade ao teste IDRМ, os outros dois (MHOM/BR/89/IM3597 e MHOM/BR/93/IM3991) apresentaram-se reatores positivos com endureção de 10,0 x 10,8 mm e 46,0 x 60,2 mm, respectivamente. Geralmente o que se observa nos casos de forma clínica mucosa são indivíduos com uma resposta a IDRМ altamente reativa. Este dado confirmou-se na resposta de hipersensibilidade tardia (IDRМ) no paciente MHOM/BR/93/IM3991. Este último altamente reativo era paciente do sexo masculino que já havia contraído LTA há 10 anos atrás, tendo curado clinicamente, apresentando alterações na região nasal com dificuldades respiratórias a cerca de oito meses, quando realizado o diagnóstico.

MHOM/BR/89/IM3597: criança do sexo feminino, sete anos de idade, com lesão cutânea suspeita de LTA (sem confirmação parasitológica) no membro inferior esquerdo, usou medicação (quatro injeções de benzetacil e glucantime) verificando-se cicatrização da lesão cutânea no período de um mês. Um mês após a cicatrização, observou-se o surgimento de lesão na mucosa nasal (alterações nas áreas septais das narinas) e 12 meses depois buscou diagnóstico para esta infecção. Sua moradia refere-se ao bairro da Alvorada II em Manaus. No entanto, a mesma visitava balneário no km 47 da AM 010. A mãe relatou ocorrência de vários casos de LTA neste local. IDRМ reativo, reisolamento do parasita de biópsia da mucosa nasal em animal de laboratório.

MHOM/BR/93/IM3991: adulto do sexo masculino, 36 anos de idade, agricultor, apresentando lesão mucosa na região nasal. Em 1982 apresentou lesão cutânea no membro

superior esquerdo, seguida de outras lesões disseminadas pelo corpo, tratado com 50 doses de glucantime. Onze anos depois notou surgimento de lesão na mucosa nasal com incômodos respiratórios e sintomas de sinusite. Morador do Km 452 da BR 147, acostumado a caçar. O paciente após uso de 70 ampolas de glucantime ainda apresentava atrofia e fibrose da cabeça do corneto inferior esquerdo, sem sinais de processo infeccioso nasal com mucosas íntegras em fase de resolução da infecção. Paciente altamente reativo na IDRMM, com presença de linfonodo regional infartado. Exame direto positivo e reisolamento do parasita de biópsia da mucosa nasal em animal de laboratório.

MHOM/BR/95/IM4094: adulto do sexo masculino, 23 anos de idade, operador de moto serra, morador do bairro do Coroado III em Manaus, portador de HIV. Em 1986 contraiu LTA no Rio Javari, AM, desenvolvendo cinco lesões cutâneas distribuídas pelos membros inferiores que cicatrizaram após uso de 10 ampolas de glucantime. Três anos após o tratamento, verificou-se a presença de alterações na mucosa nasal, agravado após trauma na região, aumentando assim o processo inflamatório. Em 1995 o paciente procurou atendimento, apresentando uma lesão na testa, uma no membro inferior direito, perfuração no septo nasal e a região nasal com edema e perfurações de septo. Paciente não reativo na IDRMM, exame direto negativo para lesão do membro inferior e da testa, e positivo para lesão da narina com reisolamento do parasita de biópsia da mucosa nasal em animal de laboratório.

2. Detecção do nível de isotipos de imunoglobulinas pelo método de ELISA em indivíduos humanos infectados por *L. (V.) guyanensis*:

Um total de 36 soros de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) foram testados para a presença dos isotipos de IgG, IgM, IgA e IgE contra o antígeno homólogo.

As análises sorológicas permitiram determinar níveis séricos de IgG e IGM em indivíduos com a forma clínica cutânea e mucosa de acordo com a diluição dos soros. Níveis de imunoglobulinas séricas IgE e IgA não foram detectados pelo método utilizado.

Na figura 7, verifica-se os níveis séricos de IgG, numa diluição de 1:40 nos soros controles (controle negativo e positivo) do teste.

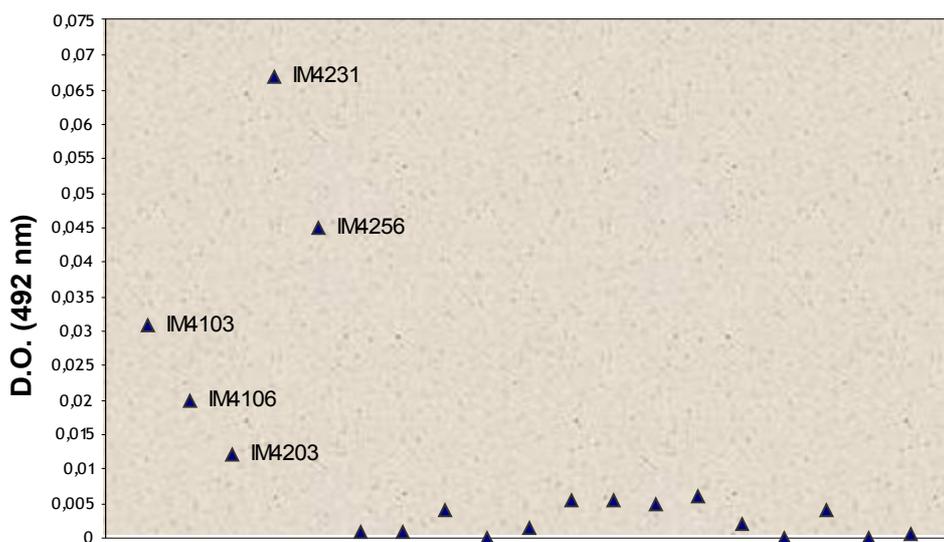


Figura 7. Níveis séricos de IgG, na diluição de 1:40 em soros de pacientes controles (Tabela 1.) do teste de ELISA.

Na figura 8, dos três casos de forma mucosa contígua, verifica-se a presença de níveis detectáveis de IgG na diluição de 1:40, em apenas um dos pacientes (MHOM/BR/95/IM4094), que apresentava-se em fase destrutiva da mucosa nasal, com lesões cutâneas, portador de HIV e não reator para IDR. Os outros dois pacientes não produziram títulos consideráveis de IgG sérico. Quanto a detecção dos títulos de IgM, IgA e IgE nestes pacientes, os valores encontrados de DO (densidade ótica) foram considerados negativos.

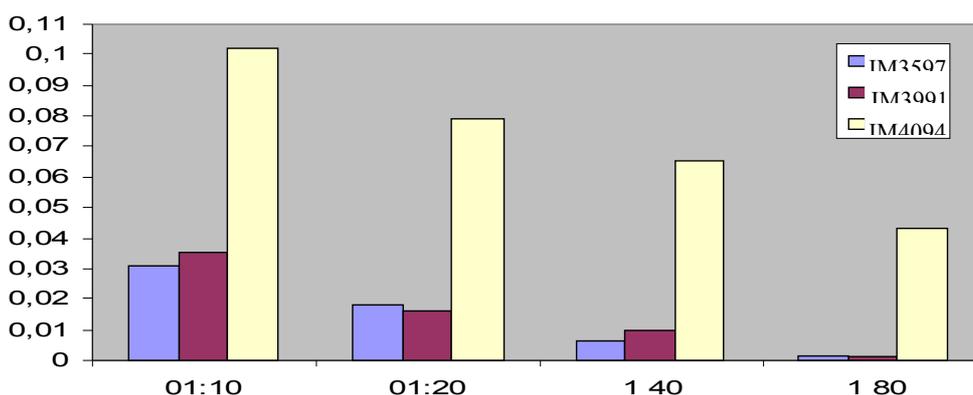


Figura 8. Níveis séricos de IgG (em diferentes diluições) detectados pelo método de ELISA em pacientes com a forma clínica mucosa contígua de Leishmaniose causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Valores de Cut-off em diferentes diluições 1:10 = 0,026; 1:20=0,0056 1:40=0,0062 e 1:80=0,023166.

Na figura 9, observam-se os níveis séricos de IgG em três diluições (1:20, 1:40 e 1:80) de 12 pacientes com a forma cutânea de *L. (V.) guyanensis*, que não realizaram intradermoreação. Nota-se resposta humoral em alguns destes casos com produção de níveis de IgG variáveis.

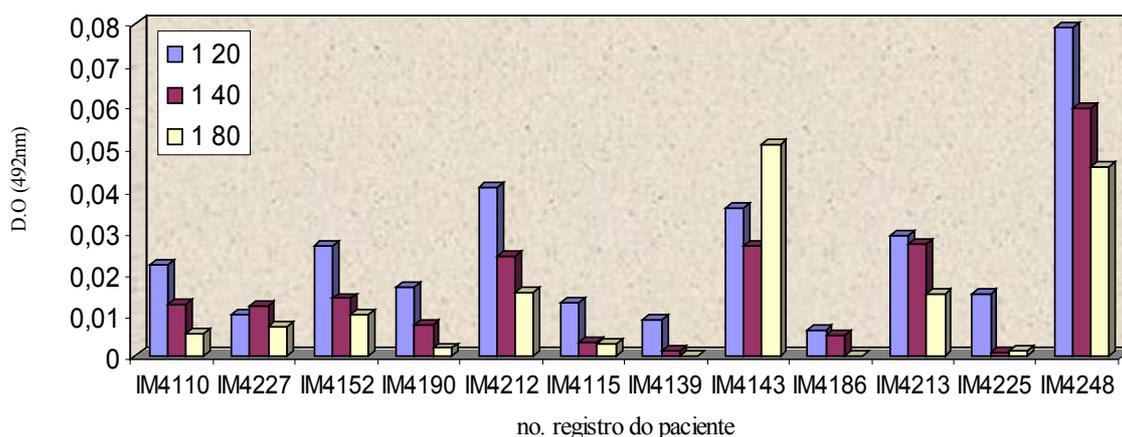


Figura 9. Títulos de IgG pelo método de ELISA de casos de Leishmaniose Tegumentar em indivíduos que não realizaram a intradermoreação. Valores de Cut-off em diferentes diluições diluição 1:20: 0,0066; 1:40: 0,0037; 1:80: 0,0025.

Resultados sorológicos foram agrupados graficamente de acordo com os valores de enduração obtidos pela IDR. Apesar de observada variação individual quanto a produção de anticorpos nos casos de leishmaniose cutânea, não verificou-se relação direta com a resposta ao teste intradérmico, apesar dos níveis detectáveis de IgG ou níveis um pouco mais reduzidos deste isotipo em indivíduos com valores elevados no teste intradérmico (Figura 10). No entanto, a amostragem foi pequena para que se possa discutir a relação dos níveis humorais de anticorpos em pacientes com *L. (V.) guyanensis* com a resposta de hipersensibilidade tardia. Não foi detectada a presença de níveis de imunoglobulinas IgE no soro destes pacientes.

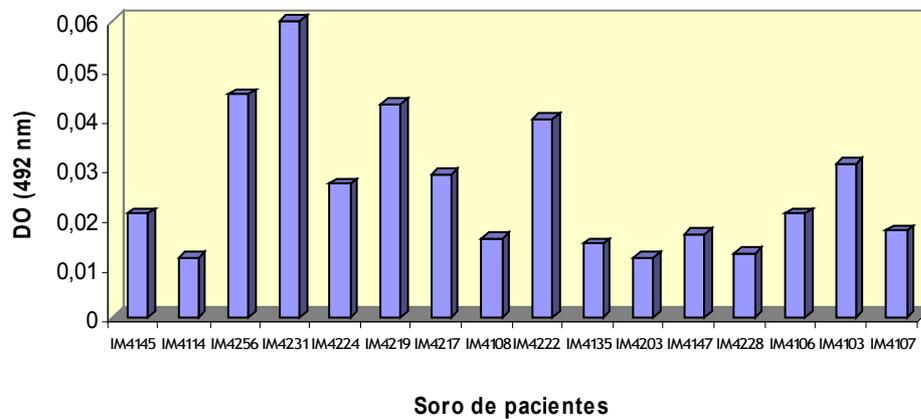


Figura 10. Título de IgG (diluição 1:20) pelo método de ELISA de casos de Leishmaniose agrupados de acordo com os valores de enduração obtidos pela IDR. Valor do Cut-off na diluição de 1:20 : 0,006.

Na tentativa de relacionar os níveis de produção de IgG com a fase da doença na figura 11 observa-se que pacientes em fase crônica apresentaram baixos valores séricos deste isotipo.

Na Figura 12 observa-se os níveis séricos de IgM na diluição de 1:20, em pacientes com a forma cutânea de *L. (V.) guyanensis*, que apresentavam evolução da doença entre 15 dias e oito meses. Além de reduzidos níveis de IgM, não verificou-se relação direta com o tempo de evolução da lesão.

Na figura 13 verifica-se comparativamente os níveis séricos de imunoglobulinas IgG e IgM em indivíduos que desenvolveram a forma cutânea, com relação ao tempo de evolução. Apesar do reduzido número amostral observa-se o aumento dos níveis de IgG em relação a IgM em alguns dos pacientes com 1 mês de infecção.

Na figura 14 observam-se os baixos níveis séricos de IgG e IgM em pacientes com a forma mucosa, com exceção do paciente IM4094, HIV positivo, IDRМ negativo e que produziu níveis mais elevados de IgG.

Figura 11. Títulos de IgG na diluição de 1: 20, pelo método de ELISA de casos de Leishmaniose Tegumentar em indivíduos em fase aguda e crônica. Valor do Cut-off na diluição de 1:20: 0,005.

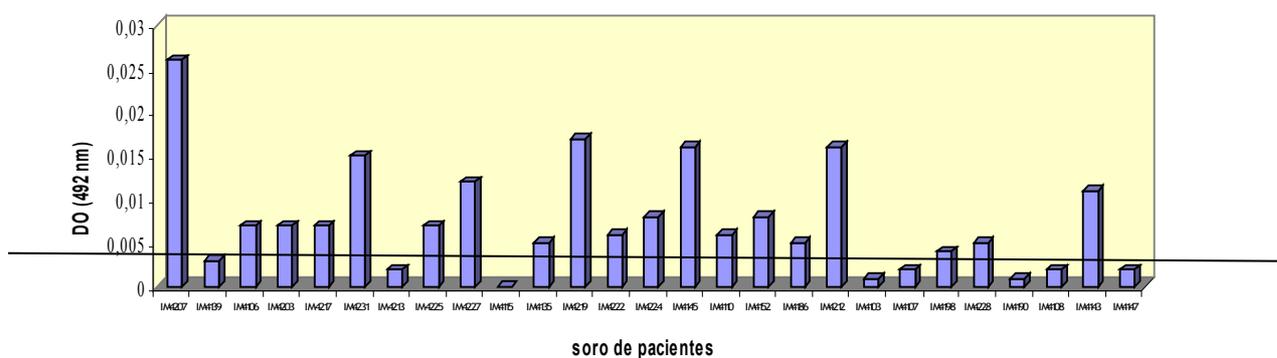


Figura 12. Títulos séricos de IgM na diluição de 1:20, em pacientes com a forma cutânea de *L. (V.) guyanensis*, que apresentavam evolução da doença entre 15 dias e oito meses. Valor do Cut off na diluição de 1:20: 0,004

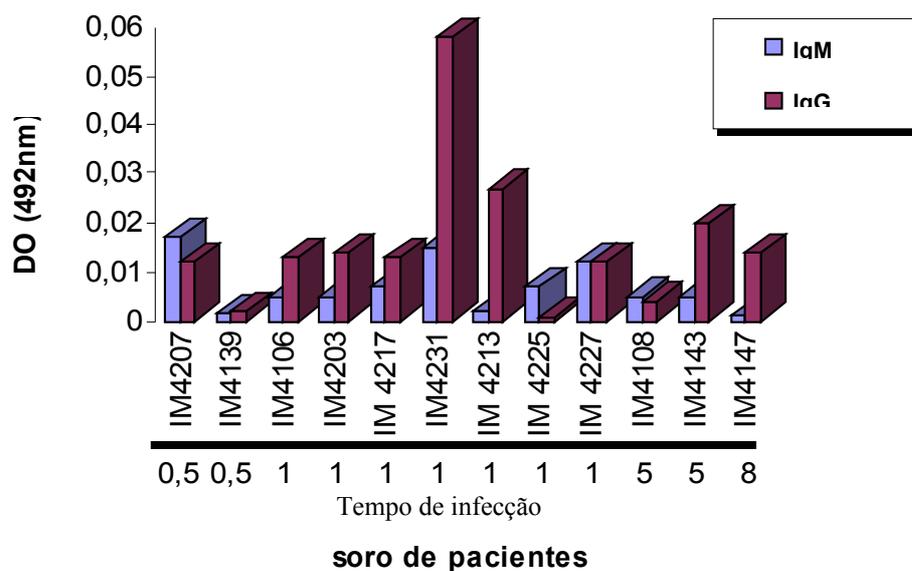


Figura 13. Níveis séricos de anticorpos (IgG e IgM) na diluição de 1:40 em pacientes infectados com a forma cutânea de *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Valor do Cut-off na diluição de 1:40 para IgM: 0,0019 e IgG: 0,005.

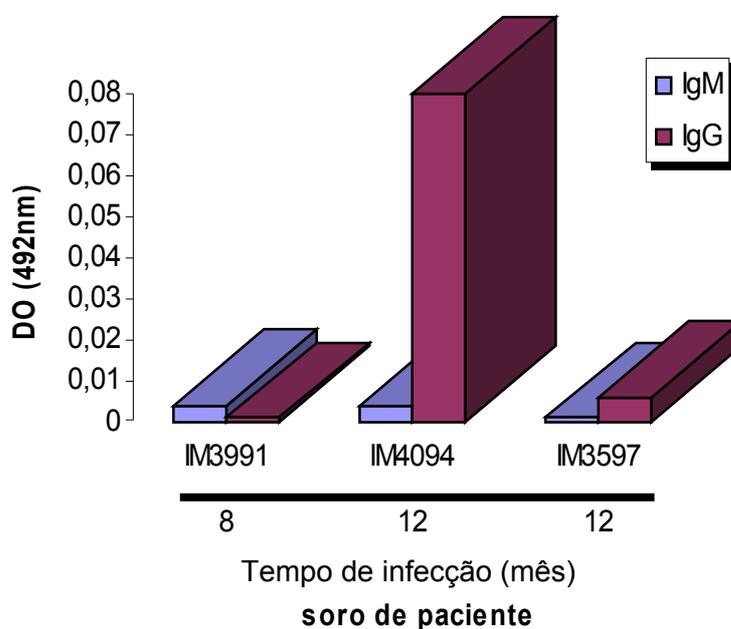


Figura 14. Níveis séricos de anticorpos (IgG e IgM) na diluição de 1:40 em pacientes infectados com a forma mucosa de *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Valor do Cut-off na diluição de 1:40 para IgM: 0,0019 e IgG: 0,005.

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em áreas endêmicas freqüentemente é baseado nos aspectos clínicos, algumas vezes combinados com exames parasitológicos e/ou imunológicos, nem sempre eficazes.

Os métodos tradicionais de diagnóstico da LTA envolvem a detecção de amastigotas nos exames de esfregaço e histopatológico de tecidos e cultura de promastigotas (parasitológicos). Os métodos indiretos de diagnósticos são os imunológicos que incluem a sorologia e o teste intradérmico. Estes testes são realizados com a utilização de parasitas íntegros ou extratos, constituindo-se como uma valiosa ferramenta no diagnóstico da LTA.

A técnica empregada no presente trabalho foi de ensaio imunoenzimático - Elisa. Esta técnica utiliza extratos do parasita e o antígeno é aplicado em solução bruta. A leishmaniose vem ocorrendo de forma endêmico-epidêmica apresentando diferentes padrões de transmissão, relacionados não somente à penetração do homem em focos silvestres, mas freqüentemente ocorre em áreas de expansão de fronteiras agrícolas. Tem-se evidenciado a presença da doença em áreas de colonização antigas. Nestas, é possível que tenha havido adaptação dos vetores e reservatórios a ambientes modificados. A doença é um importante problema de saúde pública pela sua magnitude e transcendência .

Neste trabalho um total de 36 soros de pacientes, com diagnóstico clínico e portador de lesões compatíveis com leishmaniose tegumentar causada por *L. (V.) guyanensis*, foram analisados, demonstrando maiores prevalências para o sexo masculino e nas faixas etárias entre 20 e 59 anos, principalmente nas estradas AM- 010 e Br-174, possivelmente estão relacionadas a uma maior exposição desses indivíduos aos vetores nas suas atividades de lazer e não laboral como é característico desta infecção.

Segundo Name et al. (2005), a leishmaniose mucosa contígua pode ocorrer em qualquer idade, sendo mais freqüente em indivíduos entre vinte e quarenta anos, devido ao tempo de evolução da doença. O acometimento mucoso ocorre em 1/3 dos casos, o que explica a presença de apenas três (8,4%) paciente relatados neste estudo. Geralmente esta forma se manifesta tardiamente (dois a dez anos após o início da infecção) do mais comum em pacientes com idades acima de trinta anos, no entanto verificamos a presença de um paciente com apenas sete anos de idade e que já desenvolvia a doença a um ano.

Segundo Passos et al. (1993), o maior número de leishmaniose tegumentar americana entre homens e adultos sugere transmissão extradomiciliar em população economicamente ativa, enquanto essa ocorrência entre mulheres, crianças e pessoas com ocupação não agrícola sugere a transmissão intra e/ou peridomiciliar, além do que, o baixo número de casos no sexo feminino indica que não está havendo urbanização da doença, que ainda mantém caráter essencialmente de ciclo silvestre.

A verificação da maioria dos pacientes com lesão única, nos membros superiores e/ou inferiores com um tempo médio de evolução da doença de 30 dias confirmam dados observados por Rosen (1994) e por Guerra (2003).

No aspecto laboral, os indivíduos com atividade nas proximidades ou em contato direto com a floresta apresentam maior número de casos (CASTRO et al., 2002). Porém esta relação direta dos casos de LTA com a atividade profissional não foi observada neste estudo (Figura 6), alguns desses casos, principalmente em estudantes e técnicos que desenvolviam atividades profissionais em campo, assim como, operador de moto-serra e militar apresentaram infecção em decorrência da exposição em área de mata. Na maioria dos casos verifica-se que a infecção geralmente ocorre devido a atividades de lazer, como a visitação a balneários em igarapés próximos a áreas devastadas em ambientes rurais. Essas notificações

de pessoas com contágio de LTA devido a atividades de lazer também ocorrem em outras regiões do Brasil (CASTRO et al., 2002).

A infecção por *Leishmania* normalmente, leva à indução de resposta imune complexa, caracterizada tanto por reações mediadas por células como pela produção de anticorpos. A natureza da resposta imune celular desempenha um papel fundamental na determinação da resposta imune humoral pela produção de isotipos específicos de imunoglobulinas (RODRIGUEZ et al., 1996). Diferentes fases da doença em que se encontram os pacientes no momento do diagnóstico clínico podem ser fatores determinantes para diferenciar títulos de anticorpos. Entretanto, a determinação de anticorpos não pode ser usada isoladamente para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas. (CHIARI et al., 1973 a, b; MENDONÇA et al., 1988).

Em LTA, a forte imunidade mediada por células e a predominância de isotipos IgG nas leishmaniose cutâneas tem sido associadas ao perfil de resposta Th1 (CASTES et al., 1983; CARVALHO et al., 1985). Neste estudo detectou-se a classe IgG anti-*Leishmania* presente na maioria das amostras de soros de pacientes com LTA (Figura 9), confirmando dados da literatura.

Alguns trabalhos da literatura demonstram que existe uma correlação positiva entre altos índices de IgE e a reação de Montenegro, sugerindo que estes anticorpos participam do processo de imunorregulação na leishmaniose cutânea. Além disso, Rocha et al. (1999) detecta em pacientes nos estágios iniciais de LC, maior produção de IL-10 em detrimento de IFN- γ , ocorrendo troca deste perfil ao longo da evolução da doença, onde citocinas pró-inflamatórias passam a ser predominantes. No entanto, apesar de 29 dos 36 pacientes estarem em fase inicial da doença e 19 pacientes terem tido reação de Montenegro positiva, níveis significativo de isotipos de IgE não foram detectados.

Pacientes com LM costumam apresentar IDRM exacerbada com vários centímetros de endureção, o que se confirmou no paciente MHOM/BR/95/IM3991, o qual apresentou maior endureção verificada neste estudo, e negativados em pacientes soropositivos para HIV, dado confirmado no pacientes MHOM/BR/95/IM4094, com IDRM negativo e soropositivo para HIV (figura 6), assim como altos títulos de anticorpos da classe IgG anti-leishmania, que não são anticorpos protetores (CRUZ et al., 1992)

Dados da literatura demonstram que níveis de IgM se correlacionam com a fase inicial da LTA, assim como altos níveis de IgA estão relacionados com comprometimento mucoso (LABRADA, *et al.*, 1989). Embora muitos dos pacientes apresentassem pouco tempo de evolução das lesões, altos níveis de anticorpos da classe IgM não foram detectados, assim como não foram detectados níveis significativos de IgA em pacientes com lesão mucosa, diferindo assim de dados da literatura.

Os testes sorológicos detectam anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro dos pacientes com títulos geralmente baixos.. Nas lesões ulceradas por *L. (V.) braziliensis* a sensibilidade do ELISA está em torno de 70% no primeiro ano da doença; enquanto que nas lesões por *L. (V.) guyanensis* a sensibilidade é menor. Alguns pacientes são persistentemente negativos.

6. CONCLUSÕES

A análise dos casos de Leishmaniose tegumentar causada por *L. (V.) guynensis* nos permitiu concluir que:

No município de Manaus é possível identificar a provável existência de dois padrões epidemiológicos da transmissão da LTA. O padrão clássico, com o acometimento principalmente de adultos, de homens, de lavradores, ao lado de um novo padrão, com aumento do acometimento de mulheres, de faixa etária heterogenias e de profissão não relacionadas com atividades na mata, e procedentes de regiões metropolitanas;

AIDRM é um método auxiliar no diagnóstico que deve ser analisado cuidadosamente principalmente quando realizados em primoinfecção e em formas mucosas e forem considerados negativos.

A análise comparativas dos dados obtidos no presente estudo permitiu concluir que:

A técnica sorológica pelo método de ELISA utilizando como substrato o OPB é sensível para detectar a presença das imunoglobulinas séricas de IgG e IgM em humanos infectados com a *Leishmania (Viannia) guyanensis*;

Verificou-se que a infecção pela *Leishmania (Viannia) guyanensis* leva a produção de baixos níveis de IgG e IgM, não devendo ser considerada como método útil no diagnóstico e sim como acompanhamento da evolução da infecção.

1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA N, ROUQUAYROL MZ. Introdução à epidemiologia moderna. Produtos do conhecimento, 1990; Cap. III: 27-48.
- AMATO VS, ANDRADE JR HF, DUARTE MIS. Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop* 85: 39-49, 2003.
- ANDRADE MS, BRITO MEF, SILVA ST, LIMA BS, ALMEIDA EL, ALBUQUERQUE EL, MARINHO JUNIOR JF, ISHIKAWA E, CUPOLILLO E, BRANDAO FILHO JF. Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* em uma área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38:229-233, 2005.
- ARAÚJO FILHO, N. A. Leishmaniose Tegumentar Americana e o desmatamento da Amazônia. *Acta Amazônica*. v.11(1): pp187-189. 1981
- ARIAS CJ. R; FREITAS R. A. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the central Amazon of Brazil. *Anlaan*, v.7, p.293-294, 1977.
- ASHFORD, R.W.; DESJEUX, P.; DE RADET, P. Estimation of populations at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitol Today*, v.8, n.3, p. 104-105, 1992.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses". *International Journal for Parasitology*, v° 30, pp.1262-81, 2000.
- ATTA AMJR, D'OLIVEIRA A, CORREA J, ATTA MLB, ALMEIDA RP, CARVALHO EM. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 59, p. 426-430, 1998.
- BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A; MACHADO, PRL; JESUS, A. M. R.; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J.; CARVALHO, E. M.: Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients; *Infection and Immunity*; p. 6734; 6740, 2002.
- BADARÓ R, REED SG. Leishmanioses. In EW Ferreira, SLM Ávila (eds), *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-ímmunes*, 2nd ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 255-262, 2001.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JR, G. MOMEN, H. McMAHON-PRATT, D.; de JESUS, A.R.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETO, M.; CARVALHO, E.; JOHNSON JR, W.D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.44, n.5, pp. 536-546, 1991.
- BOGDAN C, GESSNER A, SOLBACH W, ROLLINGHOFF M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol*, v.18, p.517-525, 1996.

- BOGDAN C, ROLLINGHOFF M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol*, v. 28, p.121-134, 1998.
- BOMFIM G, NASCIMENTO C, COSTA J, CARVALHO EM, BARRAL-NETTO M, BARRAL A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic responses in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*, v.8, p.188-194, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v.72, p.248-254, 1976.
- BRANDÃO FILHO, S. P. Wild and synanthropic hosts of leishmania (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.*, [S.l.], v. 97, p. 291-296, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Normas Técnicas para Diagnóstico, Tratamento e Controle da LTA*. Port.1402/MS de 14/08/2000.
- BRASÍLIA, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006. 320p. (Série B Textos Básicos de Saúde) *Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso*. 6.ed.rev. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_bolso_6ed.pdf.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : *Editora do Ministério da Saúde*, 2007.
- CÁCERES-DITTMAR, G. *et al.* Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin. Exp. Immunol.*, [S. l.], v. 91, p. 500-505, 1993.
- CARVALHO, E. M. *et al.* Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Journ. Imm.*, [S. l.], v. 135, p. 4144 - 4148, 1985.
- CARVALHO EM, BARRAL A, COSTA JM, BITTENCOURT A, MARSDEN P. Clinical and disseminated immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.*, v. 56, p. 315-325, 1994.
- CASTÉS M., AGNELLI A., VERDE O, RONDON A.J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopathol*, v. 27, p.176-186,1983.
- CASTRO, E. A. *et al.* Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 35, n. 5, p. 445-452, 2002.
- CENEPI. Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana, 2000.

CHIARI, C.A.; MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P.A. Reação de Imunofluorescência Indireta no controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.15, pp.298-303, 1973.

CHIARI, C.A.; MAGALHÃES, PA; MAYRINK, W. Pesquisa de anticorpos por Imunofluorescência em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana apresentando lesões cutâneas recentes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, ;v.15, pp. 304-309. 1973

COFFMAN, RL; CARTY, J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by IFN-g. *J. Immunol.*, v.136, p.949-954, 1986.

COFFMAN, RL *et al.* IFN-g regulates the isotypes of Ig secreted during *in vivo* humoral immune responses. *J. Immunol.*, v.140, p.1022-1027, 1988.

CUNNINGHAM AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol.* v.72,p.132-141, 2002.

CRUZ A.M.; MACHADO E.S.; MENEZES J.A.; RUTOWITSCH M.S.; COUTINHO S.G. Cellular and immoral immune response of patient with American cutaneous leishmaniasis and AIDS. *Trans R Soc Trop vied Hyg*, v. 86, p. 511-2, 1992.

da-CRUZ AM, BITTAR R, MATTOS M, OLIVEIRA-NETO MP, NOGUEIRA R, PINHO-RIBEIRO V, AZEREDO-COUTINHO RB, COUTINHO SG. T-Cell-Mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: Long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* v. 9, p. 251-256, 2002.

DESJEUX, P. Leishmaniasis public aspects and control. *Clinics in Dermatology*, v. 14, n. 5, p. 417- 423, 1996.

d' UTRA e SILVA, OSCAR. Sobre a leishmaniose tegumentar e seu tratamento. *Mewmórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.7, pp.213-247, 1915.

EDILEUZA, M.; BRITO, F.; MENDOÇA, M.; GOMES, Y.; JARDIM, M.; ABATH, F. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot analysis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 7, p. 318-321, 2000.

ENGVALL, E.; PERLAMANN, P. Enzyme Linked Immunosorbent Assay -ELISA. *Journal of Immunology*, v.109, p.129-135, 1972.

FERREIRA, A.W; AVILA, S.L.M.; *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001 p.443.

GONTIJO B, CARVALHO MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.36, p. 71-80, 2003.

GUERRA, J.O.; Costa, Y.C.; CASTELLÓN, E.G.; A leishmaniose visceral (calazar) no Estado de Roraima. In: *Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima* (R.I. Barbosa,

E.J. Ferreira & E.G. Castellón, orgs.), pp. 157-179. Manaus: *Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia*, 1998.

GUERRA JAO, SOUZA AS, LIMA AA, DIAS CMF, GUERRA MVF. Leishmaniose tegumentar americana (LTA) – avaliação de dois anos de trabalhos com reservatórios em área periférica da cidade de Manaus. *Rev Soc Bras Med Trop*; v.34 Suppl 1, p220, 2001.

GUERRA, R.M.S.N.C.; ALFELD, V.F.; TEIXEIRA, W.C.; MELO, F. A.; FEITOSA, M.L.T. Fauna parasitária de cães no município de São Luís/MA : estudo preliminar. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA*, v.18,p. 41, 2003.

GUTIERREZ Y, SALINAS GH, PALMA G, VALDERRAMA LB, SANTRICH CV, ARAIVA NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 45, p.281-289, 1991.

GRIMALDI, G Jr.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.6, n.3, p.230-250, 1993.

GRIMALDI, G.; MOMEN, H.; NAIFF, R.D.; MCMAHON-PRATT, D.; BARRETT, T. Characterization and classification of leishmanial parasites from human, wild mammals and sand flies in the amazon region of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.44, p. 645-661, 1991.

JUNQUEIRA PEDRAS M, ORSINI M, CASTRO M, PASSOS VMA, RABELLO A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, v. 47, p. 477-485, 2003.

KEMP M. Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections. *APMIS Suppl.*, v. 68, p.1-33, 1997.

LABRADA, M., WEIGLE, K., VALDERRAMA, L. AND SARAVIA, N. Evaluacion de la respuesta de isotipos de inmunoglobulina especifica a *Leishmania* en leishmaniasis tegumentaria Americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 84:409-416, 1989.

LAINSON, R., SHAW, J.J. Leishmaniasis of New World: taxonomic problems. *British Medical Bulletin*, v.28, p.44-48, 1972.

LAINSON R. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon region of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18: 47-56, 1985.

LAINSON, R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the Neotropics.. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, n. 3, p. 377-387, 1997.

MACHADO, P., KANITAKIS, J., ALMEIDA, R., CHALON, A., ARAÚJO, C., CARVALHO, E.M. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Dermatol.* V.12, pp. 449-451, 2002.

- MATTA, N. E.; NOGUEIRA, R. S.; SOUZA, I. S.; FRANCO, A M^a .; MARISE, M.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; COUTINHO, S. G.; LEON, L.; DA-CRUZ, A. M^a. Immunological responsiveness of cutaneous leishmaniasis patients from endemic area of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Amazonas highland. Submetido a Clinical infectious Diseases, 2005
- MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). *Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg.*, [S. l.], v. 80, p. 859-876, 1986.
- MARZOCHI, M. C. A.; SCHUBACH, A.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. *Parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. São Paulo: Atheneu, 1999.
- MARZOCHI, MAURO C. A. 'Epidemiologia e possibilidade de controle das leishmanioses no Brasil'. *Perspectivas tecnológicas em saúde: os desafios da leishmaniose e da febre amarela*. Fiocruz, Bio-Manguinhos, nº 1, pp. 24-6. 2001
- MARY, C.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S.; QUILICI, M. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: Potencial of 14-KD and 16-KD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *American Journal of Tropical Medicine and Higiene*;; v.47, n.6, pp.764-771, 1992.
- MATOS, D. S. et al. Differential interferon-gamma production characterizes the cytokine responses to *Leishmania* and *Mycobacterium leprae* antigens in concomitant mucocutaneous leishmaniasis and lepromatous leprosy. *Clin. Infect.*, [S.l.], v. 40, n. 2, p. 5-12, 2005.
- MILLS KH, MCGUIRK P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. *Semin Immunol.* v.16, p. 107-117, 2004.
- MOLL, H. Immune responses to parasites: the art of distinguishing the good from the bad. *Imm. Today.*, [S. l.], v. 17, p. 551-552, 1996.
- NAME R. Q., BORGES K. T, NOGEIRA L.S.C, SAMPAIO J.H.D., TAUIL P.L, SAMPAIO R.N.R. Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana, atendidos no Hospital Universidade de Brasília, DF, Brasil. *An Brás Dermatol.*, v. 80, pp 249-54, 2005.
- NAIFF, R. D.; TALHARI, S.; BARRET, T. V.. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesion of the nasal mucosa. *Men. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 83, p. 529-530, 1988.
- OLIVEIRA-NETO, M. P. et al. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis *leishmania braziliensis* in periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, [S. l.], v. 83, p. 427-435, 1988.
- O'NEIL CE, LABRADA M, SARAIVA NG. *Leishmania (Viannia) panamensis*-specific IgE and IgA antibodies relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.49, p.181-188, 1993.
- PAES, M. G. Estudo de quatro espécies de *Lutzomyia* França, 1924 (Diptera, Psychodydae), em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar Americana na periferia de Manaus (Amazo-

nas – Brasil). *Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas*, Manaus, Amazonas. 128 p, 1991.

PAES, M.G., BARROS, M.L.B. TOLEDO, L.M. Considerações sobre a produção da leishmaniose Tegumentar americana no estado do Amazonas. In INIGUEZ- ROJAS LB, TOLEDO, LM. Espaço & Doença, um olhar sobre o Amazonas. Editora FIOCRUZ; p. 1-8, 1998.

PESSÔA, S. B.; BARRETTO, M. P. Leishmaniose tegumentar americana. *Ministério da Educação e Saúde*, p.527, 1948.

PINHEIRO, F. G. Infecção natural em *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward & Fraiha, 1977 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) por *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Amazonas, Brasil. 2004

PIRMEZ C, YAMAMURA M, UYEMURA K, PAES-OLIVEIRA M, CONCEIÇÃO-SILVA F, MODLIN RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *Journal Clinical Investigation*, v. 91, p.1390-1395, 1993.

RABELLO, E. Formes cliniques de la leishmaniose tégumentaire. In: CONGRÈS DES DERMATOLOGISTES ET SYPHILIGRAPHES DE LANGUE FRANÇAISE, 12., 1923, Strasbourg. [*Annales...*]. Strasbourg: [s.n.], 1923.

_____. Les origines de la leishmaniose tégumentaire au Brésil. In: CONGRÈS DES DERMATOLOGISTES ET SYPHILIGRAPHES DE LANGUE FRANÇAISE, 12., 1923, Strasbourg. [*Annales...*]. Strasbourg: [s.n.], 1923.

ROCHA P.N.; ALMEIDA R.P.; BACELLAR O.; de JESUS A.R.; FILHO C.D.; BARRAL A, COFFMAN R.L.; CARVALHO E.M.; Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *The journal of infectious Diseases*, v. 180, pp. 1731-1734, 1999.

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 Immunol*, v. 18, p. 341-345, 1996.

ROGERS KA, DEKREY GK, MBOW ML, GILLESPIE RD, BRODSKYN CI, TITUS RG. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett* 209: 1-7, 2002.

ROMERO, G.A.; ORG, M. G.; GUERRA, M. V.; PAES, G. M.; MACEDO, V.; CARVALHO, E. M. O. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania(Viannia) brasiliensis* or *Leishmania(Viannia) guyanensis* in Brazil: *Acta Trop.*,v. 93, p. 49-56, 2005.

ROSEN, T. & Koff, A. Treatment of cutaneous leishmaniasis. *Dermatology*, 31 (5): 693-708. 1994.

SAMPAIO, S.A.P., RIVITTI, E.A. *Dermatologia*. 2ed. São Paulo: Artes médicas, 2001.

SANCHES, M.C.A. Testes sorológicos in FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S.L.M.; Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imune. 2 ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan. P 09-48, 2001.

SANTOS-GOMES, G, GOMES-PEREIRA, S, CAMPINO, L, ARAUJO, MD, ABRANCHES, P: Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral Leishmaniasis in human immunodeficiency virus-Leishmania sp.-coinfecting patients. *J Clin Microbiol.* v. 38, p.175–178, 2000.

SARAVIA, N. G.; VALDEMARA, L.; LABRADA, M. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *Journal infec. Disease.*v. 26, p. 725-35, 1989.

SILVEIRA TG, TEODORO U, LONARDONI UM, GUILHERME AL, TOLEDO MJ. Epidemiologic aspects of cutaneous leishmaniasis in an endemic area of the state of Paraná, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública.* v. 12, p.141-147, 1997.

SILVEIRA, F.T.; ISHIKAWA, E.A.; DE SOUZA, A.A.A.; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused By *Leishmania (Viannia) lindenbergi* sp. n., a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite* , v.85, p.43-50, 2002.

SOARES R. P. P.; TURCO S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v 75 (3), p.301-330, 2003.

SOUSA-ATTA MLB, SALOMÉ GS, D'OLIVEIRA JR A, ALMEIDA RP, ATTA AM, CARVALHO EM. Immunoglobulin E antileishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, p. 101-104, 2002.

SOUZA, M.A.; PEREIRA DE, S.M.C.; CÔRTE-REAL, S. *Leishmania major*: Parasite Interactions suggesting Sexuality. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , v.92, n.6, p. 761-766, 1997.

SOUZA, M. A ; SILVA, A. G.; CARDOSO, S. R. A.; SILVIO, F. J.; FERREIRA, M. S. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.38 no.2 Uberaba Mar/Apr. 2005

TRUJILLO C, RAMIREZ R, VELEZ ID, BERBERICH C. The humoral immune response to the kinetoplast membrane protein-11 in patients with American Leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunology Letters*,v.70, p.203-209, 1999.

VIANNA, G. Com. à sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. *Bol. Soc. Brasil. Dermat.*, [S. l.], v. 1, p. 36-38, 1912.

_____. Sobre o tratamento da leishmaniose tegumentar. *Annaes Paulistas de Medicina e Cirurgia*, [S. l.], v. 2, p. 167-169, 1914.

_____. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota preliminar). *Brazil Médico*, [S. l.], v. 25, p. 411, 1911.

WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Immunology of leishmaniasis. *Modern Parasite Biology*. v. 11, p.200-221, 1990.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the Leishmaniasis. *Technical Report Series*, v.793, p. 158, 1990.

WORD HEALTH ORGANIZATION 2004. Disponível em: <http://www.who.int/en/>.

Acesso: 24 de setembro de 2005.