

## DETECÇÃO DE IGG EM PACIENTES INFECTADOS COM *LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS* ANTES E APÓS A CURA CLÍNICA

Renata Wanderley NOGUEIRA<sup>1</sup>; Flávia Regina Almeida CAMPOS<sup>2</sup>; Thaís Tibery ESPIR<sup>3</sup>; Luanda de Paula FIGUEIRA<sup>3</sup>; Silmara PENNINI<sup>3</sup>; Francimeire Gomes PINHEIRO<sup>3</sup>; Maricleide Farias NAIFF<sup>3</sup>; Antonia Maria Ramos FRANCO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/INPA; <sup>2</sup>Co-orientadora CPCS/INPA; <sup>3</sup>Colaboradora CPCS/INPA; <sup>4</sup>Orientadora CPCS/INPA

### 1. Introdução

As leishmanioses são, na maioria das vezes, zoonoses infecto-parasitária que afetam várias espécies de animais silvestres, domésticos e o homem, apresentando clinicamente um caráter multifacetado (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993). Esta doença requer uma maior atenção principalmente no que se refere ao padrão de cura da mesma, que atualmente é eminentemente clínica, considerando-se curado o paciente que apresenta lesão totalmente cicatrizada.

Muitos casos são diagnosticados clinicamente pelo aspecto da lesão. Para se evitar a ocorrência de enganos no diagnóstico, estes podem ser reduzidos com o auxílio dos métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares (Silveira *et al.*, 1999). Quanto aos estudos sorológicos, a pesquisa de anticorpos circulantes tem constituído uma grande esperança no controle de cura dos doentes e várias investigações nesse sentido indicam a sua utilidade (Bittencourt *et al.*, 1968; Chiari *et al.*, 1969; Chiari *et al.*, 1973; Talhari *et al.*, 1988; Sousa-Atta *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2006).

O intuito deste trabalho foi averiguar questões como: características e quantidade de lesões cutâneas, tempo de evolução da doença e a detecção de IgG sérico em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) com lesão ativa e após cura clínica, cujo agente etiológico foi identificado como *Leishmania (Viannia) guyanensis*, espécie responsável por 83% dos casos no estado do Amazonas.

### 2. Material e Métodos

**Material biológico:** Foram avaliados 14 pacientes com idade acima de 18 anos, de ambos sexos, diagnosticados para *L.(V.) guyanensis*, oriundos dos municípios de Manaus e Rio Preto da Eva (Amazonas/Brasil) e tratados com N-metilglucamina. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do INPA (processo nº 230/2009).

**Amostras de soro:** Todas as amostras foram colhidas e manipuladas de acordo com as normas de biossegurança e ética. Foram obtidas de pacientes com diagnóstico clínico confirmado ou compatível com LTA, caracterizada pela presença de úlceras cutâneas simples ou múltiplas, atendidos na Unidade Básica Manuel Romão/ Rio Preto da Eva e no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do INPA. As amostras de soro controles (três) foram obtidas de voluntários saudáveis, sem histórico clínico de leishmaniose. Amostras de cinco pacientes com diagnóstico diferencial provenientes da Fundação Alfredo da Matta também foram utilizadas para avaliação de reatividade cruzada. O material foi encaminhado ao Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas/CPCS/INPA, para obtenção do soro após centrifugação e posterior realização dos ensaios sorológicos. Os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e responderam a questionário referente à epidemiologia da doença.

**Coleta e preparo das amostras:** Foi realizada escarificação da borda das lesões e deste material foram preparadas lâminas para pesquisa direta de amastigotas e cultivo em meio NNN (Novy e MacNeal, 1904; Nicolle, 1908) para obtenção de promastigotas. Após crescimento parasitário em cultivo e amplificação em meio RPMI (SIGMA- 1640), foi realizada caracterização bioquímica por eletroforese de isoenzimas (G6PDH, ME, IDH, 6PGDH, MDH, HK e ACON) para identificação da espécie. Os pacientes foram submetidos à punção endovenosa de sangue antes e após cura clínica. O soro obtido foi centrifugado e armazenado em freezer -80° C até a realização do ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto para a detecção de IgG circulante.

**Ensaio imunoenzimático (ELISA):** O ensaio foi feito em microplacas de 96 poços (Nunc@ Maxisorp, Denmark), utilizando-se o anticorpo de cabra anti IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma)

numa diluição de 1/40.000. A revelação da reação foi realizada utilizando-se o substrato OPD (o-phenylenediamine/Sigma) numa concentração de 0,5mg/mL em tampão citrato (pH 5,0). A dosagem de anticorpos foi realizada em leitor de ELISA (Bio-Tek) em comprimento de onda de 450nm. Foram utilizados soros controles para o cálculo do Cut-off.

### 3. Resultados e discussão

Um total de seis mulheres (43%) e oito homens (57%) foram examinados, com idade variando de 21 a 55 anos. O tempo de infecção destes pacientes até a realização dos exames foi de duas semanas a dois meses. O número de lesões variou de uma a nove, sendo a de menor tamanho medindo 0,8x0,6cm e a de maior 10,8x8,5cm. O tipo de lesão predominante foi úlcera típica (93%) seguido por impetigóide (MHOM/07/BR/5456) e verrucosa (MHOM/06/BR/5316). O tempo de intervalo entre as coleta de sangue dos pacientes antes e depois do tratamento variou de dois a 52 meses (Tabela 1).

Tabela 1. Características da infecção em pacientes com *Leishmania (Viannia) guyanensis* oriundos de Rio Preto da Eva e Manaus/AM.

(a) antes do tratamento com N- metil glucamina; (b) após a cura clínica; UT: úlcera típica.*									
Código da amostra	Sexo	Idade (anos)	Tempo de Infecção (dias)	Intervalo de coleta (meses)	Nº de lesões	Tamanho da Lesão (cm)	Título IgG (a)	Título IgG (b)	Tipo de Lesão
MHOM/05/BR/5301	F	27	14	52	1	2,5x1,6	-	-	UT
MHOM/06/BR/5314	F	49	30	46	1	---	-	-	UT
MHOM/06/BR/5316	F	41	90	52	-	>10,8x8,5	-	-	UT/ Verrucosa
MHOM/06/BR/5329	M	26	---	52	9	>3,5x2,9 <0,9x0,6	1:80	1:80-	UT
MHOM/07/BR/5458	M	33	---	38	2	1,6 x 3,5	1:80	1:80-	UT
MHOM/07/BR/5468*	M	26	60	36	6	1,0 x1,0	1:80	1:80	UT
MHOM/07/BR/5471	F	20	---	38	1	0,8 x 0,6	-	-	UT
MHOM/07/BR/5456	M	26	30	37	2	3,0x3,4 5,5x3,2	1:80+	-	Impetigóide
MHOM/07/BR/5479*	M	38	30	35	1	1,3x1,3	1:80-	1:20-	UT
MHOM/08/BR/5515	M	55	20	14	7	3,0x2,0	1:80	1:80	UT
MHOM/08/BR/5520	M	53	60	10	5	3,0x1,6 1,1x1,1	1:80	1:80-	UT
MHOM/09/BR/5595	M	21	30	12	1	1,2x1,5	-	-	UT
MHOM/10/BR/5637	F	30	60	2	1	1,7x1,8	1:80	1:80-	UT
MHOM/07/BR/5669	F	36	15	32	1	1,0x1,4	-	-	UT

Pacientes apresentaram lesão suspeita de LTA anteriormente.

Quanto a reatividade para IgG, seis pacientes (43%) não apresentaram-se reativos, sendo cinco mulheres (83%). Após cura clínica, sete, de oito (87%) pacientes continuaram reativos para igG. Destes, cinco pacientes (62%) apresentaram titulação baixa (1: 80-) e dois (25%) continuaram com alta reatividade (1: 80+). Somente um paciente (MHOM/07/BR/5456, 13%) com titulação de 1:80+ antes do tratamento não apresentou reatividade após cura clínica.

Foram selecionados cinco pacientes com diagnóstico diferencial para LTA apresentando dermatoftoses sendo um com neoplasia basocelular. Não se verificou reatividade cruzada com antígeno de *Leishmania* (Tabela 2).

Não houve qualquer correlação quanto a reatividade para IgG com o número e tamanho das lesões dos pacientes, com o tempo de evolução da doença, bem como com o intervalo entre a primeira e a segunda coleta. Souza *et al.* (2005), estudando o perfil de isotipos de IgG em pacientes com LTA observaram que não foi possível estabelecer correlação entre tempo de evolução da lesão dos pacientes e a avidade das imunoglobulinas, corroborando com este estudo.

Testes sorológicos têm sido empregados no diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos da LTA. 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. Variados perfis e níveis de imunoglobulinas específicas a *Leishmania* têm sido detectados em pacientes com LTA, parecendo

refletir não só a carga parasitária, mas também a espécie envolvida, o tempo de infecção e fatores intrínsecos do próprio hospedeiro (Sousa-Atta *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2006). Entretanto, Romero *et al.* (2001) e Matta *et al.* (2009) observaram que os anticorpos anti-leishmania contra *L. guyanensis* produzidos durante a infecção não são suficientes para promoverem proteção frente à doença e o seu papel na patogênese tem sido negligenciado. No entanto, altos títulos de anticorpos geralmente são detectados durante a forma ativa ou em pacientes que sofrem de graves formas clínicas de leishmaniose. Durante a doença ativa, infecções de *L.(V.) guyanensis* produzem resposta imune humoral mais baixa que *L.(V.) braziliensis*. Estes dados indicam que o parasita de *L.(V.) guyanensis* é um indutor mais fraco no hospedeiro que a *L. (V.) braziliensis*. A indução de altos níveis de citocinas do tipo II pode também desempenhar um papel importante neste cenário, ao alterar as respostas Tipo I e também permitindo a replicação contínua do parasita, que mantém o processo patogênico em *L. (V.) guyanensis*.

**Tabela 2.** Características da infecção em pacientes com diagnóstico diferencial, atendidos no hospital Alfredo da Matta, Manaus, AM.

Código da amostra	Sexo	Idade (anos)	Tempo de Infecção (dias)	Data da última coleta	Nº de lesões	Tamanho da Lesão (cm)	Título IgG (a)	Tipo de Lesão
MHOM/10/BR/5655	F	18	810	23/04/2010	1	1,6x1,8	-	UC
MHOM/10/BR/5656	F	23	120	23/04/2010	1	5,0x6,0	-	UC
MHOM/10/BR/5660	F	28	360	14/05/2010	1	3,0x2,5	-	UT
MHOM/10/BR/5661	F	44	180	14/05/2010	1	2,2x2,2	-	UT
MHOM/10/BR/5634	F	26	15	22/02/2010	1	1,7x1,5	-	UT

(a) antes do tratamento específico; UC: Úlcera crostosa; UT: úlcera típica.

#### 4. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o perfil de reatividade a IgG dos pacientes estudados não demonstra que este pode ser considerado uma possível ferramenta de diagnóstico ou de cura clínica para LTA, uma vez que não houve nenhuma relação entre os parâmetros analisados e a expressão dessa imunoglobulina. Sugerimos a necessidade do aumento do número de casos estudados, bem como investigação de outras imunoglobulinas (IgM, IgA e IgE) e sub-classes de IgG. Dois parâmetros importantes que devem ser avaliados em futuras pesquisas são a duração da terapêutica utilizada pelos pacientes e a parasitemia dos mesmos. Devido a apenas 57% dos pacientes apresentarem reatividade para IgG, esta proteína não pode ser considerada como um marcador de infecção ou de cura clínica.

#### 5. Referência Bibliográfica

- Bittencourt, AC, Sodré, A; Andrade, ZA . 1968- Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescência na leishmaniose tegumentar. *Revista Instituto Medicina Tropical*, São Paulo.10: 247-252.
- Chiari, CA; Furtado, T.; Porto, RV. 1969. Pesquisa de anticorpos circulantes pesa imunofluorescência na Leishmaniose Tegumentar Americana. XXI Congresso Brasileiro de Dermatologia Recife.
- Chiari, CA; Magalhães, PA.; Mayrink, W. 1973. Pesquisas de anticorpos por imunofluorescência em soros de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana apresentando lesões cutâneas recentes. *Revista Instituto Medicina Tropical* São Paulo, 15: 304-309.
- Matta, N.E.; Nogueira, R.S.; Franco, A.M.R.; Souza, I.S.; Mattos, M.S.; Oliveira-Neto, M.P.; Coutinho, S.G.; Leon, L.L.; Da-Cruz, A.M. 2009. Leishmania (Viannia) guyanensis induces Low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic área of the Brazilian amazon highland. *The American Society of Tropical Medicine and hygiene*. 80 (3) pp. 339-344.
- Silveira, T. G. V.; Arraes, S. M. A. A.; Bertolini, D. A.; Teodoro, V.; Lonardon, M. V. C.; Roberto, A. C. B. S.; Ramos, M.; Sobrinho, A. N.; Ishikawa, E.; Shaw, J. 1999. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná,sul do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical*, 32(4):413-423.

- Thomaz-Soccol, V.; Lanotte, G.; Rioux, J.A.; Pratlong, F.; Martini-Dumas, A.; Serres, E. 1993. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross,1903. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*; 68:107-108.
- Reis, L.C.; Brito, M.E.F.; Souza, M.A.; Pereira, V.R.A. 2006. Mecanismo imunológico da resposta celular e humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista de Patologia Tropical*. Vol. 35 (2): 103-115. maio-ago.
- Romero, G.A.S.; Guerra, M.V.F.; Paes, M.G.; Macêdo, V.O. 2001. Comparison of Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* v. 65 (5), p.456-465.
- Sousa-Atta MLB, Salame GS, D`Oliveira Jr A, Almeida RP, Atta AM, Carvalho EM. 2002. Immunoglobulin E antileishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. *Clinical Diagnosis of Laboratory Immunol* 9: 101-104.
- Souza MA, Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto Junior S, Ferreira MS. 2005. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 137-141.
- Talhari, S.; Arias, J.R.; Cunha, M.G.S.; Naiff, R.D.; Naiff, M.F.; Freitas, R.A.; Barrett, T. 1988. Leishmaniose no Estado do Amazonas-Aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos: *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v.63 (6), p.433-438.