

ALEX MAGNO COELHO HORIMOTO

**FREQUÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS E DOSAGEM DE
COMPLEMENTO SÉRICO EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE
LEISHMANIOSE CUTÂNEA OU VISCERAL**

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-
OESTE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO
GROSSO DO SUL, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE.**

Orientador: Prof. Dr. Izaias Pereira da Costa

CAMPO GRANDE

2008

ALEX MAGNO COELHO HORIMOTO

**FREQUÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS E DOSAGEM DE
COMPLEMENTO SÉRICO EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE
LEISHMANIOSE CUTÂNEA OU VISCERAL**

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-
OESTE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO
GROSSO DO SUL, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE.**

Orientador: Prof. Dr. Izaias Pereira da Costa

CAMPO GRANDE

2008

Horimoto, Alex Magno Coelho

Frequência de auto-anticorpos e dosagem de complemento sérico em pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea ou visceral. – Campo Grande, 2008.

xii. 87p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Frequency of auto antibodies and serum complement in patients with diagnosis of visceral or cutaneous Leishmaniasis.

1. Auto-anticorpos 2. Leishmaniose cutânea e visceral 3. Lupus Eritematoso Sistêmico



BANCA DE AVALIAÇÃO DE MESTRADO

CAMPO GRANDE, 22 de Agosto de 2008

CANDIDATO: Alex Magno Coelho Horimoto

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Frequência de auto-anticorpos e dosagem de complemento sérico em pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea ou visceral

EXAMINADORES:

- Prof. Dr. Izaias Pereira da Costa, Mestrado em Medicina (Reumatologia) pela Universidade de São Paulo (1985) e Doutorado em Medicina (Reumatologia) pela Universidade de São Paulo (1998) – Presidente.

- Prof. Dra. Inês Aparecida Tozetti, Mestrado em Imunologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas (1997) e Doutorado em Ciências, área de concentração em Imunologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (2006) – Membro Titular.

- Prof. Dra. Maria Elizabeth Moraes Cavaleiros Dorval, Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Universidade de São Paulo (1985) e Doutorado em Ciências da Saúde pela Universidade de Brasília (2006) – Membro Titular.

- Prof. Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago, Mestrado em Medicina Tropical pela Fundação Oswaldo Cruz (2000) e Doutorado em Medicina Tropical pela Fundação Oswaldo Cruz (2005) – Membro Suplente.

Os homens vêem as coisas como são e perguntam:

Por quê?

Eu sonho coisas que nunca foram e pergunto:

Por que não?

BERNARD SHAW

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA (REFERENCIAL TEÓRICO).....	4
2.1 Epidemiologia.....	4
2.2 Ciclo de vida do parasita e transmissão.....	6
2.3 Modelos experimentais na leishmaniose.....	8
2.4 Imunidade celular e humoral na leishmaniose.....	9
2.5 Invasão e ativação de macrófagos.....	12
2.6 Resposta do linfócito T helper.....	13
2.7 Papel do linfócito B.....	14
2.8 Interações celulares.....	14
2.9 Citocinas.....	15
2.10 Moléculas coestimulatórias e acessórias.....	17
2.11 Resposta humoral.....	19
2.12 Diagnóstico.....	21
2.12.1 Diagnóstico de leishmaniose visceral.....	22
2.12.2 Diagnóstico de leishmaniose tegumentar.....	24
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Geral	27
3.2 Específico	27
4 MÉTODOS	28
4.1 Descrição do estudo.....	28
4.2 Seleção dos pacientes.....	28
4.3 Amostras de soro.....	29
4.4 Pesquisa dos auto-anticorpos.....	30

4.5 Pesquisa do complemento sérico.....	31
4.6 Análise estatística.....	32
5 INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO.....	33
5.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	33
5.2 Ficha de avaliação.....	33
6 RESULTADOS.....	34
6.1 Dados sócio-demográficos.....	34
6.2 Procedência.....	34
6.3 Anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	38
6.4 Anticorpo anti-nuclear (FAN).....	40
6.5 Anticorpo anti-DNA.....	42
6.6 Anticorpo anti-Sm.....	42
6.7 Anticorpo anti-RNP.....	42
6.8 Anticorpo anti-Ro (SSA).....	42
6.9 Anticorpo anti-La (SSB).....	43
6.10 Anticorpo anti-cardiolipina IgM e IgG.....	43
6.11 Fator Reumatóide (FR).....	45
6.12 Dosagem de complemento C3 e C4.....	45
6.13 Fatores de concordância entre o FAN e outros testes.....	50
7 DISCUSSÃO.....	59
8 CONCLUSÃO.....	65
9 REFERÊNCIAS.....	66
10 APÊNDICES	80
10.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1)	80
10.2 Ficha de avaliação clínica (Apêndice 2).....	83
11. ANEXOS.....	84

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. Figura 1 - Mapa ilustrando as 11 micro-regiões do Estado de Mato Grosso do Sul.....	37
2. Figura 2 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de pacientes com Leishmaniose visceral ou tegumentar, em relação ao soro anti- <i>Leishmania</i>	39
3. Figura 3 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de pacientes com Leishmaniose visceral ou tegumentar, em relação ao Fator anti-nuclear (FAN).....	41
4. Figura 4 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de pacientes com Leishmaniose visceral ou tegumentar, em relação ao anticorpo anti-cardiolipina IgG.....	44
5. Figura 5 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de pacientes com Leishmaniose visceral ou tegumentar, em relação à concentração de Complemento C3.....	46
6. Figura 6 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de pacientes com Leishmaniose visceral ou tegumentar, em relação aos resultados entre Fator anti-nuclear (FAN) e o anticorpo anti-cardiolipina do tipo IgM (ACL IgM).....	51
7. Figura 7 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de pacientes com Leishmaniose visceral ou tegumentar, em relação aos resultados entre Fator anti-nuclear (FAN) e o anticorpo anti-cardiolipina do tipo IgG (ACL IgG).....	53
8. Figura 8 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de pacientes com Leishmaniose visceral ou tegumentar, em relação aos resultados entre Fator anti-nuclear (FAN) e Complemento C3.....	55
9. Figura 9 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de pacientes com Leishmaniose visceral ou tegumentar, em relação aos resultados entre Fator anti-nuclear (FAN) e Complemento C4.....	57

LISTA DE TABELAS

1. Tabela 1 - Frequência relativa e absoluta de pacientes com Leishmaniose visceral e tegumentar, de acordo com a micro-região de Mato Grosso do Sul.....	36
2. Tabela 2 - Frequência relativa e absoluta de pacientes com Leishmaniose visceral e tegumentar, de acordo com as variáveis avaliadas neste estudo.....	48
3. Tabela 3 - Frequência relativa e absoluta de pacientes com Leishmaniose visceral e tegumentar, de acordo com os auto-anticorpos avaliados neste estudo.....	49
4. Tabela 4 - Frequência relativa e absoluta de pacientes com Leishmaniose visceral e tegumentar, de acordo com o resultado entre o teste FAN e outros testes.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS

ACR: American College of Rheumatology

anti-CCP: anticorpo anti-citrulina

APCs: células apresentadoras de antígenos

CCR1 ou CCR2: receptor de quimiocina tipo 1 ou 2

CD40L: ligante de CD40

CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FAN: Fator anti-nuclear

FOO: febre de origem obscura

FR: Fator Reumatóide

GM-CSF: fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos

IFN- γ : interferon gama

IgG, IgM, IgD, IgE ou IgA: imunoglobulina G, M, D, E ou A

IL: interleucina

LES: Lupus Eritematoso Sistêmico

MHC: complexo maior de histocompatibilidade

NO: óxido nítrico

PCR: proteína C reativa

RIFI: reação de imunofluorescência indireta

Th1 ou Th2: resposta de linfócitos T auxiliares do tipo 1 ou 2

TGF- β : fator de crescimento e transformação beta

TNF- α ou TNF- β : fator de necrose tumoral alfa ou beta

RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecciosa crônica que pode variar de um espectro que inclui acometimento cutâneo isolado com manifestação oligossintomática até acometimento sistêmico com manifestações clínicas importantes. O desenvolvimento de infecção em cada tipo de leishmaniose (visceral ou tegumentar) depende da interação complexa e intrigante entre fatores de virulência do patógeno e resposta imunológica do hospedeiro. Análises de soros de pacientes infectados por leishmaniose demonstraram a existência de auto-anticorpos contra componentes celulares e humorais. Imunocomplexos circulantes e anticorpos contra imunoglobulina G (fator reumatóide) têm sido identificados em pacientes com leishmaniose visceral e cutâneo-mucosa. Pacientes com leishmaniose visceral podem apresentar sintomas que mimetizam o quadro clínico encontrado em pacientes com diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistêmico (LES), dificultando o diagnóstico precoce e tratamento. Desse modo, objetivou-se estudar o perfil imunológico destes pacientes, através da dosagem de auto-anticorpos e complemento no soro de 90 pacientes, sendo 45 deles com leishmaniose visceral e 45 com a forma tegumentar. Os auto-anticorpos estatisticamente significantes presentes em pacientes com leishmaniose visceral foram: Fator Anti-nuclear (FAN) positivo (4,4%) ou em baixa titulação (8,9%) e anticorpo anti-cardiolipina do tipo IgG positivo (17,8%) ou indeterminado (8,9%). Encontrou-se, além disso, diminuição do complemento sérico C3 em 17,8% dos pacientes e anticorpo anti-*Leishmania* >1/80 positiva em todos os pacientes com leishmaniose visceral. Conclui-se que a forma visceral de leishmaniose pode se correlacionar positivamente com a presença de auto-anticorpos, possivelmente pelo desencadeamento de uma resposta sistêmica predominantemente humoral do Tipo Th2.

Palavras-chave: Auto-anticorpos, Dosagem de complemento, Leishmaniose visceral, Leishmaniose tegumentar, Lupus Eritematoso Sistêmico (LES)

ABSTRACT

Leishmaniasis is a chronic infectious disease that can vary of a spectrum that includes isolated cutaneous compromise even with oligo-symptomatic manifestation or systemic with important clinical manifestations. The infection development in each type of leishmaniasis (visceral or cutaneous) it depends on the complex and intriguing interaction between factors of virulence of the parasite and immunologic response of the host. Analysis of patients' serums infected by leishmaniasis, they demonstrated the existence of auto-antibodies against cellular and humoral components. Circulating immune complexes and antibodies against immunoglobulin G (rheumatoid factor) they have been identified in patients with visceral leishmaniasis and cutaneous-mucosal disease. Patient with visceral leishmaniasis they can present symptoms that mimick the clinical picture found in patients with diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus (SLE), disturbing the precocious diagnosis and treatment. Therefore, it was aimed at to study the profile immunologic of these patient ones, through the testing a panel of auto-antibodies and complement in the serum of 90 patients, being 45 of them with visceral leishmaniasis and 45 with the form cutaneous. The auto-antibodies present statistically significant in patients with visceral leishmaniasis were: Antinuclear Antibodies (ANA) positive (4,4%) or in low dilution (8,9%) and antibody anti-cardiolipin of the type IgG positive (17,8%) or uncertain (8,9%). Besides, there was decrease of the serum complement C3 in 17,8% of the patients and serodiagnostic anti-*Leishmania* >1/80 positive in all the patients with visceral leishmaniasis. It is ended that the visceral form of leishmaniasis can be correlated positively with the presence of auto-antibodies, possibly for the unleashing of a systemic response predominantly humoral T-helper type 2.

Keywords: Auto-antibodies, Serum complement, Visceral Leishmaniasis, Cutaneous Leishmaniasis, Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa crônica que pode variar de um espectro que inclui acometimento cutâneo isolado com manifestação oligossintomática até acometimento sistêmico com manifestações clínicas importantes. O desenvolvimento de infecção em cada forma clínica de leishmaniose (visceral ou tegumentar) depende da interação complexa e intrigante entre fatores de virulência do patógeno e resposta imunológica do hospedeiro¹.

Na forma visceral, o protozoário intracelular causa parasitismo intenso no sistema reticuloendotelial, comprometendo fígado, baço, medula óssea e linfonodos. Ocasionalmente altera expressivas na resposta celular e humoral, com deficiência de gama-interferon (IFN- γ), produção aumentada de fator de necrose tumoral (TNF- α) e outras interleucinas, além de hipergamaglobulinemia policlonal².

O quadro clínico da leishmaniose visceral caracteriza-se por hepatoesplenomegalia, febre, palidez, adinamia, emagrecimento, taquicardia, tosse, epistaxe, gengivorragia, mialgia, artralgia e adenopatia entre outros, tais sintomas podem ser encontrados em pacientes com diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)³.

O LES é uma patologia inflamatória crônica de caráter auto-imune, com causa multifatorial e apresentação clínica polimórfica. Sua patogênese envolve diversas condições predisponentes como componente genético, participação hormonal, fatores ambientais, agentes infecciosos e medicamentos. Associa-se à disfunção imunológica, com ativação policlonal de linfócitos B e presença de auto-anticorpos dirigidos contra antígenos nucleares, alguns dos quais participam de lesões teciduais imunologicamente mediadas. Afeta principalmente mulheres jovens e se caracteriza pela evolução com períodos de atividade e remissão. Devido ao seu quadro clínico polimórfico, pode ser confundida com diversas doenças infecciosas, incluindo leishmaniose visceral⁴.

Alguns autores descreveram casos de pacientes que preenchiam critérios diagnósticos de LES estabelecidos pelo American College of Rheumatology (ACR) e com manifestações clínicas e laboratoriais variadas que incluíam citopenias, hipergamaglobulinemia policlonal, alterações de sedimento urinário (hematúria até

proteinúria maciça), Fator anti-nuclear (FAN) positivo, artralgia e hepatomegalia. No entanto, apresentavam esplenomegalia, altos títulos de proteína C reativa (PCR), complemento normal, anti-DNA e outros auto-anticorpos negativos, que não são comuns em pacientes com LES e na sua evolução. No seguimento dos casos, concluiu-se então pelo diagnóstico de leishmaniose visceral com detecção da presença de parasitas em macrófagos da medula óssea e sorologia positiva para leishmaniose. Todas as manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes desapareceram após tratamento específico para Leishmaniose^{5 6}.

Infecções latentes na leishmaniose podem progredir para forma ativa da doença pela influência de alterações na resposta imunológica e, além disso, a imunossupressão causada pelo próprio LES ou seu tratamento pode transformar o calazar em uma doença rapidamente progressiva⁷.

Saltoglu et al. (2003) encontraram as infecções como causas mais frequentes de febre de origem obscura (FOO), com ressurgimento de doenças como leishmaniose visceral⁸. Em estudo da evolução clínica de 87 pacientes durante nove anos na Turquia, os mesmos autores encontraram as doenças do colágeno como segunda causa mais frequente de FOO, incluindo nessa categoria o LES⁸. Destaca-se que ambas as doenças devem ser consideradas no diagnóstico diferencial de FOO, sobretudo se o quadro clínico iniciar acompanhado de citopenia.

A primeira descrição de leishmaniose visceral complicando o quadro de LES ocorreu em uma mulher chinesa em 1983⁹. Desde então, encontra-se diversos relatos de leishmaniose visceral como causa de febre inexplicada e citopenia em pacientes com diagnóstico prévio de LES, o que contribui para a confusão e dificuldade do diagnóstico diferencial entre as duas patologias^{10 11 12 13 14 15 16}.

Em pacientes com LES as infecções representam as causas mais comuns de morte e frequentemente é difícil distinguir entre uma infecção concomitante e atividade de LES, pois as apresentações clínicas podem ser similares^{9 11 13}.

Outro fator complicador na diferenciação entre as duas patologias é que ambas podem se manifestar com alterações cutâneas. Vários trabalhos descrevem a existência de uma forma de leishmaniose cutânea, denominada lupóide, que se caracteriza por disseminação do nódulo inicial para formação de placa e simula o lúpus discóide^{17 18 19 20 21 22 23}.

Pacientes com leishmaniose visceral também podem apresentar manifestações

renais secundárias à disfunção imunológica, idênticas às causadas pelo LES, incluindo queda da função renal, alterações do sedimento urinário e proteinúria²⁴. Em cães, observa-se desenvolvimento de glomerulonefrites do tipo mesangial e membranoproliferativa focal ou difusa, aumento da matriz mesangial e, à microscopia eletrônica, presença de depósitos de imunocomplexos contendo IgG e IgM, além de depósito de C3²⁵.

Várias possibilidades podem explicar a manifestação de auto-anticorpos na leishmaniose visceral. Hipergamaglobulinemia é comum em pacientes com LES e está presente em todos os pacientes com calazar, decorrente da grande produção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA após ativação policlonal dos linfócitos B, o que gera formação de anticorpos específicos e inespecíficos, além de auto-anticorpos que estão expressos em baixos níveis sob condições normais²⁶.

Mimetismo molecular entre antígenos da *Leishmania* e ribonucleoproteínas é uma outra hipótese levantada por Granel et al. (2000), que encontraram produção de auto-anticorpos tais como anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA, anti-SSB e antifosfolípidos em pacientes infectados por *Leishmania*. Um terceiro mecanismo para indução de auto-anticorpos na leishmaniose pode ser atribuído à liberação de antígenos seqüestrados durante agressão tecidual e rompimento de células do hospedeiro, com exposição de antígenos previamente ocultos²⁷.

Sinais de ativação da cascata do complemento são observados em pacientes com leishmaniose visceral. Em 43,4% dos casos havia queda simultânea das frações C3 e C4, além de alteração no teste CH100, que sugere ativação da via clássica²⁴. Outros estudos detectaram altos níveis de imunocomplexos circulantes em pacientes com leishmaniose visceral e LES²⁸
29.

Ressalta-se a existência de fator reumatóide em pacientes com LES e diversas outras patologias infecciosas⁴. Chabanne et al. (1993) observaram ainda fator reumatóide IgM e IgA, por método de ELISA, em altos títulos em cães com poliartrite e leishmaniose visceral³⁰.

Concluindo, a leishmaniose visceral é uma importante patologia infecciosa observada no Estado de Mato Grosso do Sul, que pode se manifestar clínica e laboratorialmente à semelhança com o Lúpus Eritematoso Sistêmico, inclusive com formação de auto-anticorpos e comprometimento renal, hematológico, articular e cutâneo.

2. REVISÃO DA LITERATURA (REFERENCIAL TEÓRICO)

2.1 Epidemiologia

A leishmaniose é uma das mais importantes doenças infecciosas no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas em 88 países (sendo a maioria em desenvolvimento), com dois milhões de novas infecções anuais e 60 mil mortes por ano^{1 31 32}.

A leishmaniose tegumentar constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pela sua alta prevalência e capacidade de produzir deformidades³¹.

A leishmaniose tegumentar é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção e constitui um grave problema de saúde pública no Brasil. As leishmanioses cutâneas têm casos diagnosticados em praticamente todos os estados brasileiros, apresentando aumento progressivo de casos notificados e média anual de 28 mil casos nos últimos 10 anos³¹.

A partir da década de 80, verifica-se aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 37.710 (2001). Observam-se picos de transmissão a cada cinco anos, apresentando tendência de aumento do número de casos, a partir do ano de 1985, quando se solidifica a implantação das ações de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar no país. No período de 1985 a 2005, verifica-se uma média anual de 28.568 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes, verificando-se coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes, respectivamente³¹.

Na década de 80, a leishmaniose tegumentar foi assinalada em 19 estados, verificando sua expansão geográfica quando, em 2003, foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros. Observa-se ampla dispersão e, em algumas áreas apresenta intensa concentração de casos, enquanto em outras os casos apresentam-se isolados³¹.

No período de 2001 a 2003, observa-se que o maior circuito em densidade de casos da forma tegumentar foi representado pela Grande Região do Tucuruí envolvendo os estados do Pará, Maranhão e Tocantins, apresentando densidade de 551,84 casos³¹.

No Brasil, a leishmaniose visceral inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de leishmaniose visceral somaram 48.455 casos, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no país foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/100.000 hab³².

No país, a leishmaniose visceral apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste³².

Na década de 90, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos notificados de leishmaniose visceral ocorreram na região Nordeste. À medida que a doença se expande para as outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando e, no período de 2000 a 2002, a região Nordeste já representa uma redução para 77% dos casos do país³².

Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO)³².

No Estado de Mato Grosso do Sul, os primeiros relatos de leishmaniose visceral ocorreram no município de Corumbá a partir de 1980³³ e posteriormente, na década de 90, ocorreu expansão da doença para outros 34 municípios do Estado³². A partir do ano 2000, Oliveira et al. (2006) observaram foco emergente de leishmaniose visceral no município de Três Lagoas, sendo a incidência da doença de 1,83 casos em 1.000 habitantes no período de 2000 a 2003³⁵. No período de 2003 a 2006 ocorreu disseminação da doença para outras localidades e segundo dados da Secretaria de Saúde de Mato Grosso do Sul, os casos de leishmaniose visceral ocorreram preponderantemente nos municípios de Campo Grande

(média anual de 111,8 casos), seguido por Três Lagoas (média anual de 49,8 casos) e Aquidauana (média anual de 11,8 casos)³⁶.

Os agentes causais das leishmanioses humanas são protozoários que se incluem na ordem *Kinetoplastida*, na família *Trypanosomatidae* e no gênero *Leishmania* e são identificadas quatro formas clínicas diferentes de leishmaniose de acordo com a espécie infectante e resposta imunológica do hospedeiro: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea, Leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose cutâneo-mucosa³⁷.

Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota nos tecidos dos vertebrados. No país, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a espécie comumente isolada em pacientes com leishmaniose visceral³².

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar humana e oito espécies descritas, somente em animais. No entanto, no Brasil, já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste^{31 37 38}.

2.2 Ciclo de vida do parasita e transmissão

Os vetores da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, cangalhinha, entre outros^{31 37}.

No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei*^{31 37}.

Os vetores da leishmaniose visceral são insetos denominados flebotomíneos e, no país, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença: *Lutzomyia*

longipalpis e *Lutzomyia cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi* no Brasil e, recentemente, *L. cruzi* foi incriminada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul^{32 37}.

No Brasil, a distribuição geográfica de *L. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão. Esta espécie é encontrada em quatro das cinco regiões geográficas: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste^{32 37}.

No Estado de Mato Grosso do Sul, Oliveira (2006) encontrou no município de Campo Grande uma maior prevalência da espécie *Lutzomyia longipalpis* em 90,38% das amostras de flebotomíneos coletados no período de 2003 a 2005³⁹. Dorval (2006), em estudo epidemiológico, identificou outras espécies mais prevalentes de *Phlebotominae* no município de Bela Vista durante o período de 2004 a 2006⁴⁰.

Os insetos vivem preferencialmente ao nível do solo, próximos a vegetação em raízes e/ou troncos de árvores, podendo ser encontrados em tocas de animais. Gostam de lugares com pouca luz, úmidos, sem vento e que tenham alimento por perto. De um modo geral, para seu desenvolvimento requerem temperaturas entre 20 e 30°C, umidade superior a 80% e matéria orgânica. Ambos os sexos necessitam de carboidratos, que são extraídos da seiva de plantas como fonte energética. As fêmeas precisam ingerir sangue para o desenvolvimento dos ovos. Costumam então se alimentar a partir do pôr do sol até de madrugada^{31 32 34 37}.

As fêmeas dos flebotomíneos geralmente realizam um repasto sanguíneo completo para se dar um ciclo gonotrófico. O ciclo de vida completo compõem-se da seguinte forma: fase embrionária, de 7 a 10 dias, fase larvária de 15 a 50 dias, fase de pupa, de 7 a 14 dias e adulto, cuja longevidade é de 20 dias. O tempo do desenvolvimento do ovo ao adulto é de aproximadamente 60 dias, a temperatura média de 20°C^{31 32 34 37}.

No Brasil, os reservatórios mais importantes são o cão e a raposa, que agem como mantenedores do ciclo da doença. Outros reservatórios são mamíferos silvestres: roedores, canídeos, marsupiais, ungulados e edentados (ratos, gambás, tamanduá, bicho-preguiça). Os canídeos domésticos apresentam intenso parasitismo cutâneo, o que permite uma fácil infecção do inseto, e, por este fato, são os mais importantes elos na manutenção da cadeia de transmissão. A infecção no cão pode se apresentar com animais aparentemente saudáveis, até cães com doença em estágios avançados. Os sinais clínicos mais comuns da leishmaniose visceral canina são: perda de pêlos, febre prolongada, emagrecimento e ulcerações rasas em orelhas, articulações, focinho e cauda^{31 32 34 37}.

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas^{31 32 34 37}.

Após este período, as fêmeas infectantes ao realizarem um novo repasto sangüíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea^{31 32 34 37}.

Em modelos experimentais e nos hospedeiros, as promastigotas se convertem em amastigotas nos macrófagos da pele, multiplicam-se e disseminam-se para fagócitos mononucleares via hematogênica ou linfática^{41 42 43}. O desenvolvimento de leishmaniose depende da espécie do parasito infectante e da resposta imunológica do hospedeiro ao parasita⁴⁴.

2.3 Modelos experimentais na leishmaniose

A fim de melhor compreender a patogênese da doença, vários estudos têm descrito e utilizado linhagens de camundongos tanto resistentes quanto sensíveis à *Leishmania sp.* O estudo destes modelos animais trouxe um grande conhecimento da relação entre parasita e hospedeiro, além dos fatores relacionados com o desenvolvimento da doença ou não^{44 45 46 47}.

Os estudos de infecção por *Leishmania* em camundongos se baseiam na introdução subcutânea de suas diferentes espécies, sendo a principal a *L. major*, embora ainda sejam citadas espécies como *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. panamensis*^{44 45 48 49}. Os camundongos são infectados por injeção na pata traseira, cauda ou pavilhão auricular por amastigotas ou promastigotas metacíclicos. A infecção por *L. major* é caracterizada por um aumento no tamanho da lesão e do número de parasitas presentes na mesma. Em camundongos resistentes, essa resposta se desenvolve durante a segunda ou terceira semana de infecção, e durante esse período ocorre uma resposta imune efetiva, com diminuição do tamanho da lesão e do número de parasitas^{44 45 48 49}.

A resistência à infecção por *L. major* em camundongos depende de dois fatores relacionados: desenvolvimento de uma resposta imunológica mediada por células e geração de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio pela ativação dos macrófagos⁴⁴.

2.4 Imunidade celular e humoral na leishmaniose

A resposta imune adaptativa se inicia quando células apresentadoras de antígenos (APCs) internalizam os antígenos na zona de agressão, processam em epítomos pela digestão celular e, por meio das proteínas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), apresentam para linfócitos T⁵⁰.

Linfócitos T CD4⁺ ativados expressam os ligantes CD40, o receptor para IL-2 e, ao mesmo tempo, secretam a própria IL-2, o que ocasiona a expansão da população clonal ativada devido suas características mitogênicas. Desse modo, são geradas tanto células efetoras da resposta imune, quanto células de memória para resposta rápida em um segundo contato^{44 50}.

O mesmo contato da APC com o linfócito T CD4⁺ gera, nesta segunda célula através de um processo complexo, a avaliação de uma série de parâmetros do agressor e determina se a resposta auxiliar (T helper ou Th) será predominantemente celular (Th1) ou humoral (Th2). Outros fatores estão envolvidos nessa diferenciação de resposta imune, como: necessidade de citocinas indutoras do perfil no primeiro contato, atuação de moléculas co-estimulatórias, densidade de complexos MHC e antígeno na superfície celular da APC, natureza química do antígeno, entre outros^{44 50}.

As respostas celulares são indicadas contra vírus, bactérias intracelulares e outros patógenos intracelulares, como a *Leishmania*. Já as respostas humorais são mais eficazes contra infecções por helmintos, bactérias extracelulares e neutralização de toxinas⁵⁰.

As respostas Th1 e Th2 tendem a ser antagônicas e normalmente encontram-se em equilíbrio, algumas vezes inversões desta regra geralmente produzem resultados insatisfatórios, como o agravamento de uma infecção mal contida (resposta Th2 contra um patógeno intracelular) ou dano inflamatório desnecessário (resposta Th1 contra um patógeno macroscópico não-fagocitável)⁵⁰.

Em alguns casos, os patógenos intracelulares desenvolvem mecanismos adaptativos de sobrevivência, tentando modificar a resposta auxiliar para Th2 (humoral) e, desse modo, evadir o sistema imune e permanecendo intactos⁵⁰.

Na leishmaniose visceral ou tegumentar a infecção acontece de acordo com a interação da resposta imunológica do hospedeiro e de fatores de virulência do patógeno. Existe evidência de que os mecanismos envolvidos na cura ou resistência à infecção estão associados com ativação de macrófagos, levando à destruição de parasitas intracelulares⁵¹.

Com relação à imunidade celular em todas as formas clínicas da doença, a resistência do hospedeiro ao parasita na leishmaniose está associada com o desenvolvimento de uma resposta imune celular específica, mediada pelos linfócitos T CD4⁺^{52 53}. A ativação efetiva de macrófagos, em resposta à infecção por *Leishmania*, é influenciada pela expansão de linfócitos T CD4⁺ antígeno-específico T helper 1. Esta imunidade celular é consistentemente associada com a habilidade de resolver uma infecção por *Leishmania*⁴⁴.

Na imunidade adaptativa, as citocinas do Tipo 1 tais como Interferon gama (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral alfa e beta (TNF- α e TNF- β), quando produzidas pelo subtipo Th1 de linfócitos CD4⁺, desempenham um papel importante neste processo de ativação macrofágica e destruição do parasita^{54 55}. Por outro lado, os mecanismos para agravamento da doença estão relacionados aos efeitos de citocinas do Tipo 2 tais como Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 10 (IL-10) e Fator de Crescimento e Transformação beta (TGF- β), que são produzidas pelo subtipo Th2 de linfócitos CD4⁺ bem como outras células^{44 48 56}. Em um estudo, a dose infectante de parasitas pode determinar o desenvolvimento de uma resposta Th1 ou Th2 na leishmaniose, independentemente da rota de inoculação e linhagem de hospedeiro, em estudo com camundongos⁵⁷.

Pacientes que desenvolvem leishmaniose visceral tem déficit ou ausência de resposta proliferativa de linfócitos e produção de IFN- γ frente a estimulação de antígeno de *Leishmania*, e existe produção de IL-10 e IL-4 por células mononucleares periféricas^{52 58 59 60 61}.

Pacientes que desenvolvem leishmaniose cutânea têm uma vigorosa resposta de células T ao antígeno de *Leishmania*, este mecanismo leva à cura das lesões nestes pacientes, seja espontaneamente ou após terapia apropriada. Tal resposta é caracterizada por uma hipersensibilidade do tipo tardia, proliferação de linfócitos e produção de citocinas tais como IL-2 e IFN- γ ^{62 63 64}.

A doença disseminada e freqüente resistência à terapia em pacientes com leishmaniose cutânea difusa é caracterizada por um padrão de resposta de citocinas Th2, com ausência de produção de IL-2 e IFN- γ quando os linfócitos são especificamente estimulados pelo antígeno de *Leishmania*. É provável que esta resposta imune nesses pacientes leve a uma inabilidade de controlar a infecção e permitir a disseminação cutânea do parasita^{63 64}.

Na leishmaniose cutâneo-mucosa, caracterizada por lesões destrutivas de mucosa oral e nasofaríngea, com uma tendência à cronicidade da infecção, o padrão de citocinas nestes pacientes é uma mistura de resposta tipo 1 e 2, com produção de perfil de citocinas de ambos os subtipos, porém predomínio da resposta Tipo 2, o que leva à cronicidade da doença^{63 64 65}.

Na forma cutânea de leishmaniose, anticorpos específicos contra o parasita são demonstráveis, enquanto os níveis de imunoglobulinas plasmáticas são normais²⁶. Por outro lado, pacientes com leishmaniose visceral apresentam elevados níveis de imunoglobulinas, embora muitas dessas imunoglobulinas não sejam *Leishmania*-específicas²⁶.

Análise de soros de pacientes infectados por *Leishmania* demonstraram a existência de auto-anticorpos contra componentes celulares e humorais. Imunocomplexos circulantes e anticorpos contra imunoglobulina G (fator reumatóide) têm sido identificados em pacientes e cães com leishmaniose visceral e cutâneo-mucosa^{26 27 30 66}.

Possivelmente, o desenvolvimento de uma resposta sistêmica humoral, dirigida contra a *Leishmania* e também uma resposta policlonal de linfócitos B, esteja relacionada à produção de auto-anticorpos e imunocomplexos circulantes^{26 27 28 29}.

2.5 Invasão e ativação de macrófagos

A fagocitose é geralmente definida como um processo em que fagócitos (macrófagos por exemplo) englobam e digerem microorganismos e debris celulares. Fagócitos servem como uma importante defesa contra infecção. Por outro lado, parasitas tais como *Leishmania* utilizam-se da captação celular por fagócitos, por serem microorganismos intracelulares obrigatórios. Então, após inoculação dos parasitas na pele pelo flebotomíneo, a *Leishmania* desenvolve mecanismos para promover sua própria fagocitose, através da ativação do sistema de complemento, resultando em opsonização da superfície do parasita com C3b. A forma promastigota da *Leishmania* é relativamente resistente ao complexo lítico do complemento. Um dos principais receptores responsáveis pela entrada da *Leishmania* no macrófago é o receptor de complemento⁴⁴. Outro estudo tem demonstrado que a internalização da forma promastigota parece ser mediada pelo receptor fucose-manose, receptor fibronectina e pelos tipos 1 e 3 de receptores de complemento (CR1 e CR3) na superfície dos macrófagos do hospedeiro⁶⁷.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que a infecção de macrófagos com *Leishmania* é insuficiente para ativar estas células a matar os parasitas. A *Leishmania* parece ser particularmente eficiente em infectar macrófagos *in vitro* sem gerar uma resposta de ativação mensurável ou importante. Como a *Leishmania* é um parasita intracelular, não é surpreendente que o controle da infecção dependa da promoção de mecanismos efetores nos macrófagos que matem o parasita. A molécula efetora primária usada pelo macrófago para este fim é o óxido nítrico (NO). A habilidade de um macrófago de gerar NO suficiente para matar efetivamente o parasita é dependente da presença ou ausência de uma variedade de fatores imunes adicionais^{44 68}.

As duas citocinas de importância primordial para efetiva ativação de macrófagos são IFN- γ e TNF- α . A ativação do macrófago parece ser um processo de duas etapas, na qual o IFN- γ prepara o macrófago para um segundo sinal que promove uma função efetora, como o aumento na produção de NO⁶⁸. O segundo sinal é frequentemente identificado como o TNF- α ⁴⁴.

2.6 Resposta do linfócito T helper

Embora fatores solúveis sejam críticos na ativação macrofágica, interações ligante-receptor mediadas através de contato célula-célula podem ter uma profunda influência no desenvolvimento da resposta imune. A comunicação entre o macrófago e a célula T pode determinar se o hospedeiro pode efetivamente matar o parasita invasor ou se o sistema imune não vai conseguir atuar na resolução da infecção⁴⁴.

Ativação efetiva de macrófagos, em resposta à infecção por *Leishmania*, é influenciada pelos subprodutos secretados pelas células T CD4⁺ antígeno-específico (ou células T helper) *in vivo*. Estes linfócitos T tornam-se ativados em ambas linhagens de camundongos resistentes ou susceptíveis em resposta a *Leishmania*; e os produtos secretados destas células ativadas influenciam o desenvolvimento da doença. Células T CD4⁺ de camundongos resistentes à infecção secretam IFN- γ quando estimulados com antígeno de *Leishmania*, enquanto linfócitos T CD4⁺ de camundongos susceptíveis secretam a citocina IL-4 quando estimulados⁴⁴.

O fenótipo destes linfócitos T helper é referido como resposta Th1 (celular) ou Th2 (humoral), respectivamente, e é definido pelo padrão de secreção de citocinas após estimulação antigênica^{51 52 53 54 55 56 57}.

Existem algumas citocinas que são essenciais para o desenvolvimento de uma resposta celular Th1 durante estimulação antigênica, como IFN- γ , IL-12 e TNF- α ^{58 59 60}. A IL-12 promove a produção de IFN- γ principalmente pelas células natural killer, macrófagos e linfócitos Th1, e IFN- γ por sua vez, promove mais produção de IL-12. O IFN- γ não somente promove a ativação macrofágica, mas também vai apoiar o contínuo desenvolvimento de resposta imune mediada por células Th1, preserva a habilidade das células T de responder ao IL-12 e suprime o desenvolvimento de resposta Th2⁶⁹.

A resposta Th2 é vital para a promoção da imunidade humoral, através das ações de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-6, além da atuação de supressores da resposta Th1, tais como IL-10 e TGF- β ^{51 61 62}. A IL-4 inibe o desenvolvimento de uma resposta Th1 por diminuir a responsividade da célula à IL-12 e promove o desenvolvimento de células Th2 por amplificar a própria produção de IL-4⁴⁴. Outros fatores que promovem uma resposta Th2 incluem as citocinas IL-10 e TGF- β , bem como prostaglandina E2⁴⁴.

Durante uma resposta imune que realmente seja efetiva, o IFN- γ secretado pelas células Th1 é de importância crucial em dirigir a ativação dos macrófagos. Por outro lado, o desenvolvimento de uma resposta humoral Th2 ocasiona exacerbação da doença^{63 64 65}.

2.7 Papel do linfócito B

Linfócitos B não parecem se acumular na pele infectada por patógenos intracelulares tais como *Leishmania sp.* No entanto, os anticorpos desempenham importante papel na resposta imune adaptativa. Entre outras funções, a imunoglobulina G (IgG) antígeno-específica é responsável pela opsonização de patógenos, para que componentes do sistema imune inato os reconheçam como estranhos^{44 70}.

2.8 Interações celulares

Numa fase posterior de patogenicidade, o desenvolvimento de lesões clinicamente evidentes ocorre coincidentemente com o influxo de células inflamatórias, incluindo neutrófilos, eosinófilos e macrófagos⁴⁴. A infiltração maciça por polimorfonucleares logo após a infecção por *Leishmania major* sugere que tais células poderiam participar na redução da carga parasitária e no controle da disseminação da infecção⁷¹. A ação de citocinas e outros mediadores, tais como IL-8, NO, prostaglandinas, fatores quimiotáticos, lipopolissacarídeos e fibronectina, sobre as células endoteliais, induzem a expressão de moléculas de adesão e contribuem para o início do influxo de células inflamatórias, aparentemente o complemento sérico e mástocitos do sítio de infecção contribuem criticamente para esta resposta⁴⁴.

Os neutrófilos estão entre as primeiras células recrutadas para as lesões causadas por *Leishmania major*. Além da sua importância para a formação do granuloma, estas células também parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da imunidade. A depleção precoce de neutrófilos, observada em cobaias, exacerba a doença e leva ao aumento das lesões cutâneas, dos níveis de IL-4 e da carga parasitária⁴⁴.

Os macrófagos são células efetoras cruciais na indução de resposta de proteção contra a *Leishmania sp.*, estas células induzem o recrutamento de células pró-inflamatórias

(neutrófilos, eosinófilos, mastócitos) e, dessa forma, estão envolvidas na formação do granuloma que visa limpar ou restringir o crescimento de microorganismos nos sítios de infecção⁴⁴.

2.9 Citocinas

As formas clínicas da leishmaniose são influenciadas principalmente pela resposta imune do hospedeiro. A cura ou progressão da doença têm sido relacionada respectivamente à predominância de uma resposta imune Tipo Th1 (sendo IFN- γ o protótipo de citocina) ou resposta Tipo Th2 (com importante produção de IL-10)^{44 72}.

O papel principal do IFN- γ na leishmaniose humana relaciona-se à observação de que esta citocina aumenta a atividade leishmanicida dos macrófagos por elevar a produção de óxido nítrico e outras espécies reativas de oxigênio, além de aumentar a captação dos parasitas pelos macrófagos^{44 72}. Observa-se ainda que o IFN- γ não é produzido por linfócitos de pacientes com leishmaniose visceral ou cutânea difusa ativas e que sua produção encontra-se restaurada em pacientes curados de leishmaniose visceral, sendo efetiva no tratamento de pacientes com leishmaniose visceral ou cutânea^{72 73}. Elevação dos níveis plasmáticos de IFN- γ são observados durante doença ativa e a ausência da atividade de IFN- γ é a marca da leishmaniose visceral^{72 73 74}. O IFN- γ não é capaz de desempenhar uma completa atividade, provavelmente devida à presença de citocinas inibitórias como IL-10⁷⁴.

TNF- α tem sido detectado em pacientes com leishmaniose visceral, e sua presença tem sido relacionada à atividade da doença. A produção dessa citocina nestes pacientes pode estar relacionada ao desenvolvimento de sintomas como astenia, perda ponderal e anemia⁷⁵. Como anteriormente relatado, o TNF- α é freqüentemente o segundo sinal que promove uma função efetora no macrófago, tal como o aumento na produção de NO^{44 68 72}. Estudo mais recente sugeriu que um genótipo individual, no locus do TNF pode estar associado com o desenvolvimento de leishmaniose visceral sintomática ou não após infecção por *Leishmania chagasi*⁷⁶.

In vitro, a citocina TGF- β diminui a quantidade de NO produzida pelos macrófagos em resposta a estímulo de outras citocinas, e a presença de TGF- β *in vivo* tem sido relacionada com susceptibilidade à *Leishmania* em camundongos⁴⁴. Outros estudos

demonstraram que células apresentadoras de antígenos em hamsters infectados por *Leishmania donovani* produzem níveis altos desta citocina inibitória^{77 78}, e que a imunossupressão observada na leishmaniose visceral é, pelo menos em parte, atribuída à abundante produção de TGF- β no curso da infecção⁷⁷. Em camundongos BALB/c, infectados por *Leishmania donovani*, a administração de antagonistas de receptores de TGF- β resultou em inibição da replicação da *Leishmania*, porém, sem a eliminação completa do parasita⁷⁹.

O número de células secretoras de fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) aumenta, na linhagem de camundongos resistentes (C57BL/6) à *Leishmania*; na linhagem susceptível (BALB/c) aumenta o número de células secretoras de IL-3. Macrófagos derivados de estimulação com IL-3 ou GM-CSF diferem funcionalmente. Os estimulados por GM-CSF são significativamente mais responsivos ao IFN- γ e mais refratários à IL-4 (citocina responsável por mediar a supressão da atividade leishmanicida)⁸⁰.

A citocina IL-4 é central no desenvolvimento de uma resposta Th2. A IL-4 inibe o desenvolvimento da resposta Th1 por diminuir a responsividade à IL-12 e promove o desenvolvimento da resposta Th2 por amplificar a produção de IL-4⁴⁴. Linfócitos T produzem o aumento precoce de IL-4 que é crucial para promover a resposta Th2 em camundongos susceptíveis à *Leishmania*⁴⁴. A importância do aumento precoce de IL-4 é evidenciada por experimentos nos quais sua produção é neutralizada por anticorpos em animais susceptíveis e estes se tornam resistentes à infecção e desenvolvem uma resposta Th1 apropriada^{81 82}. A mesma observação ocorreu em estudos com camundongos geneticamente deficientes para IL-4 ou receptor de IL-4^{83 84 85}. Estes resultados demonstraram que a IL-4 tem um importante papel no macrófago, para a atividade efetiva leishmanicida, que parece estar relacionada à modulação da produção de IFN- γ ^{84 85}.

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina multifuncional, produzida por diversas células tais como monócitos, células endoteliais e linfócitos T. Suas funções biológicas incluem indução de síntese de proteínas de fase aguda por hepatócitos, ativação de células T e indução de diferenciação de células B⁷⁵. Antígenos de *Leishmania* induzem a produção de IL-6 por células mononucleares sanguíneas periféricas em pacientes e pessoas saudáveis, e seus níveis aumentam em humanos com leishmaniose visceral. Da mesma forma, diminuição no nível de IL-6 em leishmaniose visceral é associada com tratamento efetivo⁷⁵.

A interleucina 10 (IL-10) promove grande influência no desenvolvimento da célula Th 1 por inibir a produção da citocina IL-12⁴⁴. Outro estudo sugeriu que o balanço do nível

plasmático de IL-10 e IFN- γ na leishmaniose visceral humana é crucial para o desenvolvimento da doença⁷⁴, sendo que a produção de IL-10 se correlaciona com doença ativa e sugere-se que a depressão celular imune, que acompanha a doença ativa, pode ocorrer mais pela predominância da produção de IL-10 do que pela falta de produção de IFN- γ ^{86 87}. Outros estudos demonstraram que camundongos infectados por *Leishmania major* e *L. donovani* tratados por anticorpos anti receptores de IL-10 adquiriram cura estéril^{88 89}.

Uma das citocinas principais para o desenvolvimento de uma resposta Th1 durante estimulação antigênica é a IL-12⁴⁴. A importância da IL-12 em promover uma efetiva resposta imune mediada por células contra *Leishmania major* tem sido demonstrada em alguns estudos^{90 91}; e realçada por um experimento no qual a IL-12 foi administrada a camundongos sensíveis à infecção, tornando-os resistentes à *Leishmania major*⁹² e em outro onde a neutralização de IL-12 em camundongos resistentes os tornou sensíveis⁹³.

Um papel essencial para IL-13 na infecção por *Leishmania mexicana* parece ser a manutenção de uma resposta não curativa. Da mesma forma, camundongos que não foram responsivos à IL-13 bem como IL-4, foram significativamente mais resistentes ao crescimento do parasita durante infecção por *Leishmania mexicana*⁸⁴.

A interleucina 18 (IL-18) é uma citocina pró-inflamatória que desempenha um importante papel na ativação de células natural killer e na resposta T helper 1 (Th 1), particularmente em colaboração com IL-12. A IL-18 está criticamente envolvida na proteção contra infecção por *Leishmania major* por ativação de células Th1; e camundongos geneticamente deficientes de IL-18 ou tratados com anticorpos anti IL-18 apresentaram diminuição na produção de NO e aumento nas lesões causadas por *Leishmania*⁹⁴.

Estudo demonstrou que o nível de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) foi significativamente aumentado em pacientes com Leishmaniose cutânea após tratamento com glucantime, sugerindo que os compostos antimoniais podem ter efeitos imunoestimulantes, que são responsáveis por sua atividade antimicrobiana⁹⁵.

2.10 Moléculas coestimulatórias e acessórias

Embora fatores solúveis sejam críticos na ativação de macrófagos, as interações receptor-ligante mediadas pelo contato célula-célula, podem ter uma influência profunda no

desenvolvimento da resposta imune⁴⁴. Uma das interações celulares mais importantes é mediada pela molécula coestimulatória CD40 (presente principalmente em macrófagos, células dendríticas e linfócitos B) e seu ligante, CD40L (expressada primariamente em linfócitos T ativados)⁴⁴. Enquanto a sinalização através de CD40L em linfócitos T pode influenciar a resposta e preparação da célula T, a sinalização através de CD40 em macrófagos pode estimular a produção de NO e de IL-12⁴⁴. Também é proposto que o macrófago expressando CD40 interage com CD40L em células T para induzir produção de IFN- γ , restringindo o crescimento da amastigota⁹⁶. Na presença de IFN- γ , a interação CD40/CD40L em outro estudo induziu a morte de *Leishmania major* por macrófagos em camundongos⁹⁷. Finalmente, camundongos com deficiência genética de CD40L falharam em controlar infecção intracelular por *Leishmania donovani*, indicando que a resistência adquirida envolve a sinalização e coestimulação CD40/CD40L⁹⁸. Estes achados sugerem que interações CD40/CD40L podem ser críticas na resistência à infecção por *Leishmania major*^{44 96 97 98}. No entanto, em camundongos infectados por reduzido número de parasitas *Leishmania major*, a interação CD40/CD40L não foi requerida para o desenvolvimento ou a manutenção de resistência à infecção⁹⁹.

A natureza e amplitude de uma resposta antígeno-específico de um linfócito T é dependente de outros sinais coestimulatórios, tais como B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4, que é crucial em regular a tolerância e ativação da célula T¹⁰⁰.

As interações B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 não somente promovem ativação inicial da célula T, mas também regulam a auto-tolerância por apoiar células T CD4⁺CD25⁺ regulatórias da homeostase. O CTLA-4 pode exercer seus efeitos inibitórios de ambos os modos dependentes ou não de B7-1/B7-2. B7-1 e B7-2 podem sinalizar de modo bidirecional através da ligação de CD28 e CTLA-4 nas células T e por enviar sinais para células que expressam B7¹⁰¹. Sugeriu-se que a interação de CTLA-4 e CD28 seja um mecanismo independente de TGF- β que modula negativamente a resposta imune em pacientes com leishmaniose cutânea¹⁰². Em camundongos com leishmaniose, o CTLA-4 modulou significativamente o desenvolvimento de uma resposta Th2, e os efeitos polarizantes Th2 do CTLA-4 resultaram em exacerbação da doença independentemente de IL-4¹⁰³. Da mesma forma, o papel das moléculas coestimulatórias CD28/CD152 na regulação dos linfócitos T em camundongos com leishmaniose cutânea, foi observado após administração de anti-CD152, o que ocasionou

mudança precoce da resposta para o subtipo Th2 e exacerbação da doença acompanhada de secreção aumentada de IL-4¹⁰⁴.

Estudos em diversos modelos de inflamação têm demonstrado a importância das P e E-selectinas na migração dos linfócitos T aos tecidos inflamados. No entanto, o papel das selectinas é incerto no recrutamento de células Th1 patógeno-específico e no desenvolvimento de imunidade protetiva. Estudo encontrou que as selectinas são dispensáveis para resistência à *Leishmania major*, pois camundongos com deficiência de selectinas desenvolveram, mesmo assim, uma resposta polarizada Th1, o controle de replicação do parasita e a resolução das lesões cutâneas¹⁰⁵.

As quimiocinas são uma superfamília de citocinas de baixo peso molecular que foram inicialmente descritas por suas atividades quimioatraentes. O receptor de quimiocina tipo 1 (CCR1) é expresso na superfície de monócitos e linfócitos entre outros e não só regula a quimiotaxia de leucócitos, mas também têm papel na regulação da resposta Th1/Th2. Estudo em camundongos indicou que o CCR1 exacerbou a infecção por *Leishmania major* mais por regular positivamente a resposta Th2 do que por inibir o desenvolvimento Th1 ou influenciar na quimiotaxia de leucócitos¹⁰⁶. Por sua vez, macrófagos de camundongos expressando o receptor de quimiocina tipo 2 (CCR2) podem ser estimulados pela proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) para matar eficientemente *Leishmania major*, uma típica resposta Th1¹⁰⁷.

2.11 Resposta humoral

A presença de antígenos parasitários, expressos nas membranas dos macrófagos quando em contato com imunoglobulinas tissulares, na fase inicial da lesão, possibilitaria a instalação de uma reação antígeno-anticorpo, que explicaria o aparecimento de necrose na leishmaniose cutânea. Efetivamente, constatou-se a presença de IgA, IgG e IgM nos plasmócitos tissulares, com predomínio de IgG e foi observado nas áreas de necrose e nas paredes dos vasos inflamados o depósito de imunoglobulinas, fração C3 do complemento e fibrina¹⁰⁸.

Observou-se em 37 amostras de soros de pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea a presença de anticorpos anti-*Leishmania* das classes IgE (97%), IgG (94,6%), IgA

(57,5%) e IgM (21,5%); e os perfis das subclasses de IgG demonstraram IgG1>IgG3>IgG2>IgG4. A variação no perfil de isotipos, bem como a avidez das imunoglobulinas demonstrou a complexidade da resposta imune humoral na leishmaniose tegumentar¹⁰⁹.

Estudo em cães com leishmaniose visceral encontrou associação com produção específica de anticorpos anti-*Leishmania* de todas as subclasses de IgG, particularmente IgG1, IgG3 e IgG4¹¹⁰.

Uma grande resposta proliferativa contra antígenos de *Leishmania* foi observada em cães inoculados com promastigotas, com níveis de anticorpo anti-*Leishmania* IgG1 similar ao da infecção natural, porém produção de IgG2 aumentada em cães naturalmente infectados¹¹¹.

Em humanos, a detecção de subclasses de anticorpo IgG pode constituir uma alternativa valiosa para aumentar a eficiência de diagnósticos sorológicos de leishmaniose cutânea ou cutâneo-mucosa¹¹².

Outro estudo, com cães infectados com *Leishmania infantum*, encontrou correlação entre os níveis de subclasses IgG e progressão da doença. Observou-se anticorpos IgG1 anti-*Leishmania* indetectáveis naqueles animais que apresentavam uma forma oligossintomática ou regressiva da doença, enquanto os animais com doença ativa apresentavam altos níveis de IgG1 anti-*Leishmania*¹¹³.

Anticorpos anti-*Leishmania* das classes IgG e IgE reconhecem predominantemente carboidratos epítomos de antígenos glicosilados em leishmaniose visceral¹¹⁴. Em doenças associadas com ativação policlonal de células B e hipergamaglobulinemia, como a leishmaniose visceral, anticorpos IgE e IgG podem competir pelos mesmo epítomos¹¹⁵.

Outro estudo observou que macrófagos, ativados na presença de imunocomplexos, interromperam a biossíntese de IL-12 e secretaram altos níveis de IL-10. Sugere-se, portanto, que os imunocomplexos poderiam influenciar o desenvolvimento de imunidade célula-mediada em virtude de sua alteração recíproca na produção de citocinas¹¹⁶.

Outro trabalho também observou em soro de quatro cães infectados com *Leishmania donovani* a presença de complexos imunes circulantes, com capacidade reativa para C1q homólogo e humano¹¹⁷.

2.12 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo de leishmaniose visceral depende da demonstração de amastigotas em tecido ou do isolamento do organismo em cultura^{31 32 37 118}.

Com relação a leishmaniose tegumentar, na ocorrência de lesões típicas, o diagnóstico clínico e epidemiológico pode ser realizado, especialmente se o paciente procede de áreas endêmicas ou esteve presente em lugares onde há casos de leishmaniose^{37 119}. O diagnóstico clínico-epidemiológico pode ser complementado pela Intradermoreação de Montenegro (IDRM) positiva e eventualmente pela resposta terapêutica. Entretanto, a confirmação desse diagnóstico por métodos parasitológicos é fundamental tendo em vista o número de doenças que fazem diagnóstico diferencial com a leishmaniose tegumentar³⁷.

O quadro histopatológico na leishmaniose cutânea é representado por inflamação crônica inespecífica e, geralmente por formação de granulomas epitelióides. A plasmocitose, as alterações do colágeno e vasculares associadas completam o quadro sugestivo, porém, não característico da doença. A sua especificidade depende da demonstração dos parasitas, os quais geralmente são muito escassos. Em tese sobre leishmaniose tegumentar, a positividade do encontro de parasitas no exame histopatológico foi de 20%¹²⁰.

Em ambas as formas da doença, técnicas imunoenzimáticas, anticorpos monoclonais e testes de biologia molecular (kDNA) podem ser usados para identificar a *Leishmania*, sendo utilizadas em estudos específicos com cães^{121 122 123}. Vários testes têm sido desenvolvidos para detectar anticorpos anti-*Leishmania*^{124 125 126}. Os mais utilizados tem sido testes de ELISA e Imunofluorescência Indireta. A sensibilidade e especificidade destes testes depende do antígeno usado¹²³. Reações cruzadas são observadas com malária, hanseníase, doença de Chagas, esquistossomose entre outros¹²⁷. Recentes estudos têm procurado o desenvolvimentos de antígenos recombinantes que são mais específicos^{128 129}. Uma das dificuldades em definir a sensibilidade e especificidade de qualquer teste é a necessidade de um “gold standard” que possa ser correlacionado com a detecção direta do parasita. Testes imunológicos, como RIFI e ELISA mostram reação cruzada com outras doenças e não distinguem entre infecção presente e passada¹³⁰.

Infelizmente, não há nenhum teste ou critérios rígidos para documentar a cura após o tratamento da leishmaniose visceral. O desaparecimento da febre, ganho de peso, resolução das alterações laboratoriais, regressão da hepatoesplenomegalia são sugestivos da melhora

clínica. Em algumas situações, as amastigotas são vistas na medula e é possível que a imunidade estéril não seja obtida em muitas pessoas após o tratamento. As recorrências clínicas acontecem geralmente em até seis meses após o término da terapia³⁴.

Na leishmaniose cutânea, o acompanhamento sorológico deve ser realizado conjuntamente com a pesquisa do antígeno tecidual. Em estudo com 50 pacientes, a negativação do antígeno tecidual e a redução ou negativação dos títulos da RIFI, indicaram menor possibilidade de recidiva¹³¹. Outro estudo sugere que o padrão celular, vascular e neural encontrado em exames histopatológicos poderia ser aplicado no imunodiagnóstico de lesões ativas e cicatriciais em pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar¹³².

2.12.1 Diagnóstico de leishmaniose visceral

Com relação aos diagnósticos laboratoriais para leishmaniose visceral, encontram-se principalmente:

a) Diagnóstico Imunológico

O exame imunológico mais utilizado no Brasil é a imunofluorescência indireta (RIFI) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA). O resultado da imunofluorescência indireta é normalmente expresso em diluições. Aceita-se como positivas diluições a partir de 1:80. Nos títulos iguais a 1:40, recomenda-se a solicitação de uma nova amostra em 30 dias. O teste ELISA tem o seu resultado expresso em unidades de absorvância a um raio de luz, em uma reação com diluições fixas ou, mais comumente, apenas como reagente ou não³².

Na presença de dados clínicos e laboratoriais, um teste sorológico reagente, reforça o diagnóstico de leishmaniose visceral. Entretanto, um teste reagente, na ausência de manifestações clínicas sugestivas de leishmaniose visceral, não autoriza o início do tratamento³².

A intradermorreação de Montenegro, ou teste de leishmanina, ao contrário do que ocorre na leishmaniose tegumentar, é sempre negativo durante o período de estado da doença, não sendo assim, utilizado para o diagnóstico. Ele torna-se positivo após a cura clínica na maioria dos pacientes em um período de seis meses a três anos após o término do tratamento³².

b) Diagnóstico Parasitológico

A punção aspirativa esplênica é o método que oferece maior sensibilidade (90-95%) para demonstração do parasita (porém apresenta restrições quanto ao procedimento), seguida pelo o aspirado de medula óssea, biópsia hepática e a aspiração de linfonodos. Por ser um procedimento mais seguro, recomenda-se a punção aspirativa da medula óssea³².

Exame Direto

Uma gota do material aspirado é colocada em uma das extremidades da lâmina previamente limpa, e o material firmemente dispersado na outra direção. Após secagem, o esfregaço deverá ser fixado em álcool metílico e corado. Recomendam-se pelo menos quatro lâminas. Formas amastigotas do parasito podem ser visualizadas pelas colorações de Giemsa ou Wright, Leishman, Panóptico. O encontro de parasitas no material examinado depende do número de campos observados (200 campos devem ser examinados antes de se considerar uma lâmina como negativa)³².

Isolamento em meio de Cultura (*in vitro*)

Formas amastigotas do parasito, inoculadas em meios de cultura especiais, contendo ágar e sangue de coelho, transformam-se em formas promastigotas. O clássico meio de NNN é o mais comumente empregado. A utilização de meio líquido sobre o NNN, como o meio LIT ou de Schneider, aumenta e acelera a positividade da cultura. Uma gota do material aspirado deve ser diluído em 0,5ml de solução salina (PBS ou NaCl a 0,9%) na própria seringa. Em seguida, 0,1ml desta solução deve ser inoculada em condições estéreis, em dois tubos de cultivo. As culturas devem ser mantidas entre 24-26°C e observadas em microscopia óptica comum ou invertida, semanalmente, até quatro semanas. Os tubos positivos devem ser encaminhados para laboratórios de referência para identificação da espécie³².

Isolamento em Animais Susceptíveis (*in vivo*)

A inoculação experimental em hamsters (*Mesocricetus spp*), de amostras de tecidos de pacientes com suspeita de leishmaniose visceral, não tem valor prático no diagnóstico da doença devido ao seu tempo de positividade (1 a 3 meses)³².

c) Métodos de Diagnósticos

O método do PCR (amplificação do DNA do parasita) constitui-se em uma nova perspectiva para o diagnóstico da leishmaniose visceral, pois apresenta 94% de sensibilidade. Entretanto, os seus resultados dependem de algumas variáveis envolvidas, entre elas temos:

área endêmica; o tipo de amostra; o alvo do DNA utilizado para amplificação; o método de extração do DNA, etc³².

2.12.2 Diagnóstico de leishmaniose tegumentar

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose tegumentar se constitui fundamentalmente de três grupos de exames:

a) Exames parasitológicos

A demonstração direta do parasito é o procedimento de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução. A probabilidade de encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após um ano³¹.

Para a pesquisa direta são utilizados os seguintes procedimentos: escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa. A sensibilidade desta técnica poderá ser aumentada pela repetição do exame³¹.

Outro método é o do isolamento em cultivo *in vitro* (meios de cultivo), sendo um método de confirmação do agente etiológico que permite a posterior identificação da espécie de *Leishmania* envolvida. Os fragmentos cutâneos obtidos por biópsia da borda da úlcera são inoculados em meios de cultivo NNN – Neal, Novy e Nicolle (ágar sangue modificado) e LIT (Liver Infusion Triptose), entre 24°C e 26°C, nos quais o parasito cresce relativamente bem. Após o quinto dia já podem ser encontradas formas promastigotas do parasito, entretanto a cultura deve ser mantida até um mês sob observação antes da liberação do resultado negativo³¹.

E um terceiro método diagnóstico é o do isolamento *in vivo* (inoculações animais), quando o material obtido por biópsia ou raspado de lesão é triturado em solução salina estéril e inoculado via intradérmica, no focinho e/ou patas de hamster (*Mesocricetus auratus*); as lesões no hamster em geral desenvolvem-se tardiamente, a partir de um mês. Esses animais devem ser acompanhados por três a seis meses. Pela complexidade e alto custo, esse método é pouco utilizado, apesar de apresentar elevada sensibilidade entre os demais métodos parasitológicos³¹.

b) Exames imunológicos

Teste intradérmico (IDRM ou da leishmanina)

Fundamenta-se na visualização da resposta de hipersensibilidade celular retardada. A IDRM geralmente persiste positiva após o tratamento, ou cicatrização da lesão cutânea tratada ou curada espontaneamente, podendo negatizar nos indivíduos fraco-reatores e nos precocemente tratados. Em áreas endêmicas, a IDRM positiva pode ser interpretada como leishmaniose anterior ou mesmo aplicação anterior de antígeno de IDRM, exposição ao parasito sem doença (infecção), alergia ao diluente do teste ou reação cruzada com outras doenças (doença de Chagas, esporotricose, hanseníase virchowiana, tuberculose, cromomicose, entre outras). Nas populações de área endêmica, na ausência de lesão ativa ou cicatriz, a positividade varia entre 20 e 30%³¹.

A IDRM pode ser negativa nas primeiras quatro a seis semanas após o surgimento da lesão cutânea e testes repetidos com poucas semanas de intervalo, com finalidade de diagnóstico ou inquéritos epidemiológicos, podem induzir um “efeito reforço”. Assim, em ambas as situações, os resultados devem ser interpretados com cuidado. Após a cura clínica, a IDRM pode permanecer positiva durante vários anos sendo, portanto, de limitado valor para o diagnóstico de reativação. Pacientes com leishmaniose mucosa costumam apresentar IDRM exacerbada, com vários centímetros de enduração e presença de vesiculação no centro da reação, podendo ocorrer ulceração e necrose local. Na forma cutâneo difusa a IDRM costuma ser negativa³¹.

Testes sorológicos

Esses testes detectam anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro dos pacientes com títulos geralmente baixos. Nas lesões ulceradas por *L. (V.) braziliensis* a sensibilidade da IFI 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 negativos³¹.

As lesões múltiplas (cutâneas ou mucosas) estão associadas a títulos mais altos. Por outro lado, as lesões mucosas apresentam títulos mais altos e persistentes que as lesões cutâneas³¹.

Relatos de reação falso negativa, em pacientes com LTA e reações positivas encontradas em pacientes com outras doenças, como leishmaniose visceral, doença de Chagas, pênfigo foliáceo sul-americano, paracoccidiodomicose, esporotricose, entre outras; e em indivíduos aparentemente saudáveis, provenientes ou não de áreas endêmicas, foram

descritos. Assim, a imunofluorescência não deve ser utilizada como critério isolado para diagnóstico de LTA, podendo ser associada à IDRM ou técnicas parasitológicas, no diagnóstico diferencial com outras doenças, especialmente nos casos sem demonstração de qualquer agente etiológico³¹.

Portanto, a sorologia não é indicada como critério isolado de cura ou de previsão de recorrência. Nesses casos, a presença ou ausência de lesões tegumentares em atividade é o critério decisivo³¹.

c) Exames moleculares: reação em cadeia de polimerase (PCR)

A PCR é um método que vem sendo amplamente utilizado para fins de pesquisa. Na rotina de diagnóstico, é pouco utilizado, porém acrescenta em sensibilidade quando utilizado com os métodos parasitológicos tradicionais³¹.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar o perfil de auto-anticorpos e o consumo de complemento em pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea ou visceral.

3.2 Específicos

- Identificar as características de sexo, idade e procedência dos pacientes com leishmaniose;
- Correlacionar as formas de leishmaniose com a presença de auto-anticorpos e consumo de complemento.

4. MÉTODOS

4.1 Descrição do Estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal, fundamentado nos referenciais teóricos das características imunológicas da infecção por *Leishmania*.

4.2 Seleção dos Pacientes

a- Durante o período de Março de 2006 a Março de 2008, foram atendidos 203 pacientes com diagnóstico de leishmaniose (CID 10: B55) nos diversos ambulatorios de especialidades do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e encaminhados para o Serviço de Doenças Infecto-parasitárias do mesmo hospital, sendo um total de 138 homens e 65 mulheres. Deste total, foram selecionados 90 pacientes com diagnóstico de leishmaniose através de amostragem não-probabilística por julgamento, sendo 45 com a forma visceral e 45 com a forma tegumentar, segundo critérios expostos abaixo.

b- A seleção prévia dos pacientes foi feita a partir do levantamento dos Prontuários Médicos, do Serviço de Doenças Infecto-parasitárias do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, durante o período de Março de 2006 a Março de 2008;

c- Os pacientes para serem selecionados, deveriam obedecer os seguintes critérios:

Crítérios de Inclusão:

- Sexo: qualquer (masculino ou feminino)
- Faixa etária: acima de 12 anos de idade
- Diagnóstico de leishmaniose visceral através das manifestações clínicas de

febre, citopenia e visceromegalia, além de confirmação através do diagnóstico sorológico por Imunofluorescência Indireta (maior ou igual a 1:80) e à microscopia, pela presença de formas da *Leishmania sp* no exame de mielograma ou em cultura.

- Diagnóstico de leishmaniose cutânea através das manifestações clínicas de lesões cutâneas ou mucosas sugestivas e comprometimento de linfonodos, além de diagnóstico laboratorial baseado em exames parasitológicos (exame direto, histopatológico ou cultura) e imunológicos (intradermoreação de Montenegro, imunofluorescência indireta ou Elisa).

Critérios de exclusão:

- Pacientes que apresentaram outras doenças infecciosas associadas, neoplasias malignas e patologias autoimunes;

d- As informações necessárias para a identificação dos pacientes e clínica da doença, foram obtidas a partir dos registros médicos contidos nos prontuários de cada paciente e complementadas, se houvesse necessidade, com entrevista do paciente;

e- Foi obtida a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEP/UFMS) para utilização das informações dos prontuários (Anexo A);

f- Nos casos em que houvesse a necessidade da entrevista com o paciente, foi solicitada a concordância do paciente em participar da pesquisa após explanação e entendimento da mesma e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1)

4.3 Amostras de Soro

a- Foram utilizados para a realização da pesquisa, soros dos pacientes previamente

selecionados e que se encontravam adequadamente congelados e armazenados no Laboratório Central de Campo Grande – MS (LACEN) ou Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

b- Os soros no momento da realização dos exames, foram identificados, descongelados e divididos em alíquotas.

c- Os soros foram submetidos à pesquisa de Anticorpos antinucleares, Fator Reumatóide, antifosfolípides e complemento.

4.4 Pesquisa dos Auto-anticorpos

Os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório do Instituto de Pesquisas e Diagnóstico (IPED) da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE).

a- Anticorpos Antinucleares (FAN)

Foi utilizada a técnica de Imunofluorescência Indireta para a pesquisa do FAN, tendo como substrato as células HEp2 (técnica de FAAR) e utilizado os critérios do II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em células Hep-2¹³³, para a interpretação dos resultados.

As diluições de triagem foram de 1/40 a 1/160 na dependência da lâmpada do microscópio (20W, 50W, 100W) e a leitura do título final foi feita na última diluição em que o padrão foi observável de forma definida.¹³³.

Os soros que apresentaram titulação abaixo de 1/80 foram considerados negativos; aqueles com titulação de 1/80 a 1/160 foram considerados indeterminados; sendo positivos aqueles com título maior 1/160 e diluídos até obter-se a negatificação da fluorescência.

b- Pesquisa de anti-DNA (dupla hélice ou nativo), anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro (SSA), anti-La (SSB), anti-cardiolipina IgM e IgG.

Anti-DNA ds – Foi utilizado como substrato a *Crithidia luciliae* e utilizada técnica de Imunofluorescência Indireta, como descrita por Aarden et al. (1975)¹³⁴. Utilizando-se como contra-prova o método de enzimaímunoensaio, foram considerados positivos os valores referenciais maiores que 55 UI/ml, considerados indeterminados os valores entre 35 e 55 UI/ml e considerados negativos os valores menores que 35 UI/ml.

Para a pesquisa de anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro (SSA) e anti-La (SSB), foi utilizada técnica de ELISA, como descrita por McClain et al.(2002)¹³⁵, utilizando-se kits específicos de substrato para cada teste, seguindo-se as especificações do fabricante. (Hemagen Diagnostics, Inc). Foi considerado positivo o soro que apresentasse valor 2 vezes acima do “Cut-off”.

Anti-cardiolipina IgM e IgG – Foi utilizada técnica de ensaio imunoenzimático, considerando positivo se o título fosse maior que 30,0 UI/ml para IgG e maior que 15,0UI/ml para IgM. Foi considerado indeterminado o resultado do teste se o título fosse entre 10 a 30,0UI/ml para IgG e entre 10 a 15,0UI/ml para IgM; e considerado negativo se a titulação fosse inferior a 10,0UI/ml em ambos. O substrato utilizado foi a solução de cardiolipina purificada do Laboratório Sigma e técnica como descrita anteriormente por Gharavi et al. (1987)¹³⁶.

Fator Reumatóide – Foi utilizada técnica de Nefelometria e considerado positivo se o título fosse maior que 40 UI/ml e negativo se abaixo do mesmo valor.

4.5 Pesquisa do Complemento sérico

Para pesquisa da fração de complemento C3 foi utilizada técnica de Imunoturbidimetria e os valores referenciais foram os títulos entre 90,0 a 180,0 mg/dl; sendo considerados com diminuição da fração do complemento, os soros cujo título fosse menor que 90,0 mg/dl.

Para pesquisa da fração de complemento C4 foi utilizada técnica de Imunoturbidimetria e os valores referenciais foram os títulos entre 10,0 a 40,0 mg/dl; sendo considerados com diminuição da fração do complemento, os soros cujo título fosse menor que 10,0 mg/dl.

4.6 Análise Estatística

Foi utilizado o cálculo da média para os dados sócio-demográficos.

Foi determinada a frequência dos auto-anticorpos na sua totalidade e de cada um deles, na amostras dos soros dos pacientes da pesquisa e comparados com os dados da literatura.

A comparação entre os pacientes portadores de leishmaniose visceral e aqueles portadores de leishmaniose tegumentar, em relação às variáveis idade, concentração de Complemento C3 e C4, foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

A avaliação da relação entre o tipo de leishmaniose e as variáveis sexo, procedência, e resultados dos testes (anticorpo anti-*Leishmania*, anticorpo anti-Sm, anticorpo anti-RNP, anticorpo anti-SSA, anticorpo anti-SSB, anticorpo anti-cardiolipina IgM, fator reumatóide e complemento C3 e C4), foi realizada por meio do teste exato de Fisher. O mesmo teste foi utilizado para avaliar o tipo de leishmaniose e a coincidência entre o teste de fator anti-nuclear e os testes para anticorpo anti-cardiolipina IgM, anticorpo anti-cardiolipina IgG, fator reumatóide, complemento C3 e complemento C4.

A avaliação da relação entre o tipo de Leishmaniose e as variáveis fator anti-nuclear, anticorpo anti-DNA e anticorpo anti-cardiolipina IgG, foi realizada por meio do teste do qui-quadrado.

A comparação de percentuais de casos positivos, entre os pacientes dos dois tipos de leishmaniose avaliado neste estudo, para as variáveis anticorpo anti-*Leishmania* e complemento C3, foi realizada por meio do teste z. O mesmo teste foi utilizado para a comparação de percentuais, entre pacientes dos dois tipos de leishmaniose, para resultados coincidentes entre fator anti-nuclear e as variáveis IgM, IgG, complemento C3 e complemento C4.

Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Software” SigmaStat, versão 2.0, considerando diferenças e relações significativas quando o valor de “p” foi menor que 0,05¹³⁷.

5. INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO

5.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1)

O autor elaborou o Termo de Consentimento de acordo com as normas do Conselho Nacional de Saúde (www.bioetica.ufrgs.br/res25197.htm). O mesmo encontra-se exposto no Apêndice 1.

5.2 Ficha de avaliação (Apêndice 2)

Consistiu de instrumento desenvolvido pelo autor para avaliação dos dados de identificação e das manifestações laboratoriais dos pacientes selecionados. É composta por diversos itens tipicamente agrupados em categorias, cada uma delas planejada com o objetivo de avaliar o diagnóstico dos pacientes, frequência de auto-anticorpos e dosagem do complemento sérico.

6. RESULTADOS

6.1 Dados Sócio-Demográficos

Neste estudo foram avaliados 90 pacientes sendo que destes 50,0% (n=45) eram portadores de leishmaniose visceral e 50,0% (n=45) eram portadores de leishmaniose tegumentar.

De forma geral, a idade dos pacientes variou entre 12 e 76 anos, sendo a idade média de $35,43 \pm 16,79$ anos (média $\pm$ desvio padrão da média).

A idade dos pacientes portadores de leishmaniose visceral variou entre 12 e 76 anos, sendo a idade média de $35,67 \pm 19,55$ anos. Já a idade dos pacientes portadores de leishmaniose tegumentar variou entre 14 e 67 anos, sendo a idade média de $35,20 \pm 13,72$ anos. Não houve diferença significativa entre os pacientes portadores de leishmaniose visceral e aqueles com leishmaniose tegumentar, em relação à idade (teste de Mann-Whitney, $p=0,58$).

Entre os pacientes com leishmaniose visceral (n=45), 48,9% (n=22) eram do sexo feminino e 51,1% (n=23) eram do sexo masculino. Já entre os pacientes com leishmaniose tegumentar, 51,1% (n=23) eram do sexo feminino e 48,9% (n=22) eram do sexo masculino. Não houve diferença significativa entre o tipo de leishmaniose e o sexo dos pacientes avaliados neste estudo (teste exato de Fisher, $p=1,00$).

6.2 Procedência

Dos pacientes portadores de leishmaniose visceral (n=45), 62,2% (n=28) eram provenientes da micro-região de Campo Grande, 11,1% (n=05) eram da micro-região de Aquidauana, 8,9% (n=04) eram da micro-região de Três Lagoas, 8,9% (n=04) eram da micro-região de Dourados, 6,7% (n=03) eram da micro-região de Iguatemi e 2,2% (n=01) era da micro-região de Bodoquena. Neste estudo não foram observados pacientes com leishmaniose visceral nas micro-regiões de Alto Taquari, Baixo Pantanal, Cassilândia, Nova Andradina e

Paranaíba. Já entre os pacientes portadores de leishmaniose tegumentar (n=45), 68,9% (n=31) eram provenientes da micro-região de Campo Grande, 11,1% (n=05) eram da micro-região de Aquidauana, 8,9% (n=04) eram da micro-região de Três Lagoas, 6,7% (n=03) eram da micro-região de Dourados e 4,4% (n=02) eram da micro-região de Iguatemi. Neste estudo não foram observados pacientes com leishmaniose tegumentar nas micro-regiões de Alto Taquari, Baixo Pantanal, Bodoquena, Cassilândia, Nova Andradina e Paranaíba. Estes dados estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 1.

Dos 45 pacientes portadores de leishmaniose visceral, 62,2% (n=28) eram provenientes da micro-região de Campo Grande, sendo que os demais 37,8% (n=17) eram das demais micro-regiões de Mato Grosso do Sul. Por outro lado, entre os pacientes com leishmaniose tegumentar (n=45), 68,9% (n=31) eram provenientes da micro-região de Campo Grande e 31,1% (n=14) eram provenientes das demais micro-regiões do estado. Não houve diferença significativa entre o tipo de leishmaniose e a procedência dos pacientes (teste exato de Fisher, $p=0,52$).

Tabela 1 - Frequência relativa e absoluta de pacientes com leishmaniose visceral ou tegumentar, de acordo com a micro-região de Mato Grosso do Sul. (n=90)

Micro-região	Leishmaniose	
	Visceral	Tegumentar
Alto Taquari	0,0% (00)*	0,0% (n=00)
Aquidauana	11,1% (05)	11,1% (n=05)
Baixo Pantanal	0,0% (n=00)	0,0% (n=00)
Bodoquena	2,2% (n=01)	0,0% (n=00)
Campo Grande	62,2% (n=28)	68,9% (n=31)
Cassilândia	0,0% (n=00)	0,0% (n=00)
Dourados	8,9% (n=04)	6,7% (n=03)
Iguatemi	6,7% (n=03)	4,4% (n=02)
Nova Andradina	0,0% (n=00)	0,0% (n=00)
Paranaíba	0,0% (n=00)	0,0% (n=00)
Três Lagoas	8,9% (n=04)	8,9% (n=04)
Total	100,0% (n=45)	100,0% (n=45)

* Frequência relativa (frequência absoluta).

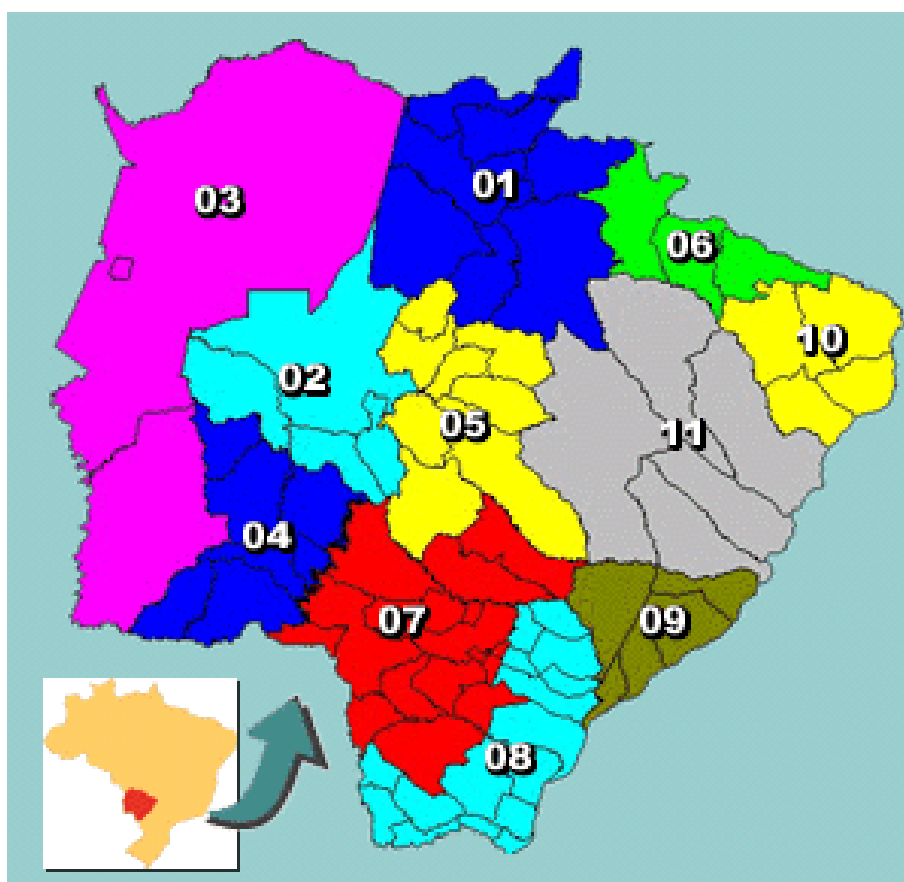


Figura 1 - Mapa ilustrando as 11 micro-regiões do Estado de Mato Grosso do Sul.
 Fonte: Secretaria Estadual de Mato Grosso do Sul.

- 1 – Alto Taquari
- 2 – Aquidauana
- 3 – Baixo Pantanal
- 4 – Bodoquena
- 5 – Campo Grande
- 6 – Cassilândia
- 7 – Dourados
- 8 – Iguatemi
- 9 – Nova Andradina
- 10 – Paranaíba
- 11 – Três Lagoas

6.3 Anticorpos anti-*Leishmania*

Todos os pacientes que eram portadores de leishmaniose visceral (100,0% - n=45) apresentavam titulação de anticorpos anti-*Leishmania* positiva ($>1/80$). Por outro lado, entre os portadores de leishmaniose tegumentar, 37,8% (n=17) dos pacientes apresentavam titulação de anticorpos anti-*Leishmania* negativa ($<1/80$) e 62,2% (n=28) deles apresentavam titulação de soro anti-*Leishmania* positiva ($>1/80$). Houve uma diferença significativa entre o tipo de leishmaniose e o resultado da titulação de anticorpos anti-*Leishmania* (teste exato de Fisher, $p<0,001$), sendo o percentual de pacientes portadores de leishmaniose visceral com anticorpos anti-*Leishmania* positivos significativamente maior do que o daqueles portadores de leishmaniose tegumentar (teste z, $p<0,001$). Estes resultados estão ilustrados na figura 2.

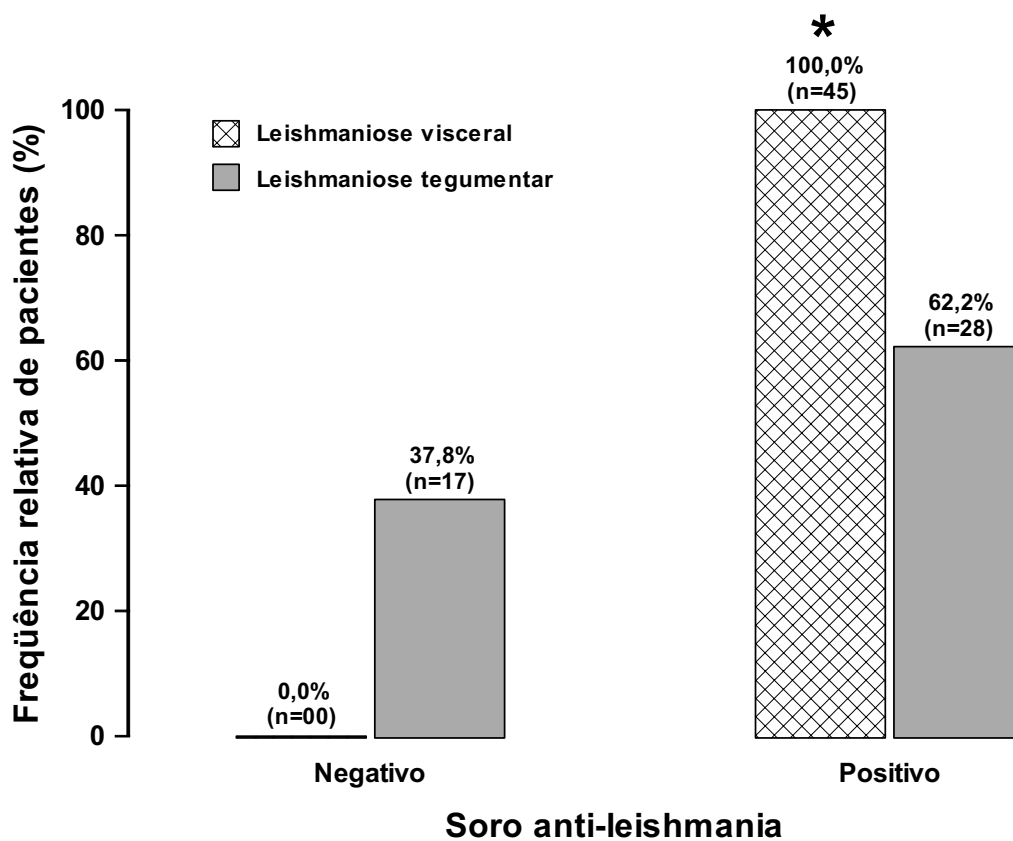


Figura 2 - Frequência relativa de pacientes com leishmaniose, em relação à presença do anticorpo anti-*Leishmania*. Cada coluna representa o valor percentual. * Diferença significativa em relação aos pacientes com leishmaniose tegumentar (teste z, $p < 0,001$).

6.4 Anticorpo anti-nuclear (FAN)

Entre os pacientes com leishmaniose visceral (n=45), 86,7% (n=39) apresentaram fator anti-nuclear (FAN) negativo, 8,9% (n=04) com FAN indeterminado e 4,4% (n=02) com FAN positivo. Já entre os pacientes com leishmaniose tegumentar, todos (100,0% - n=45) apresentaram FAN negativo. Houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e o resultado do teste de fator anti-nuclear (teste do qui-quadrado, $p=0,04$). Estes resultados estão ilustrados na figura 3.

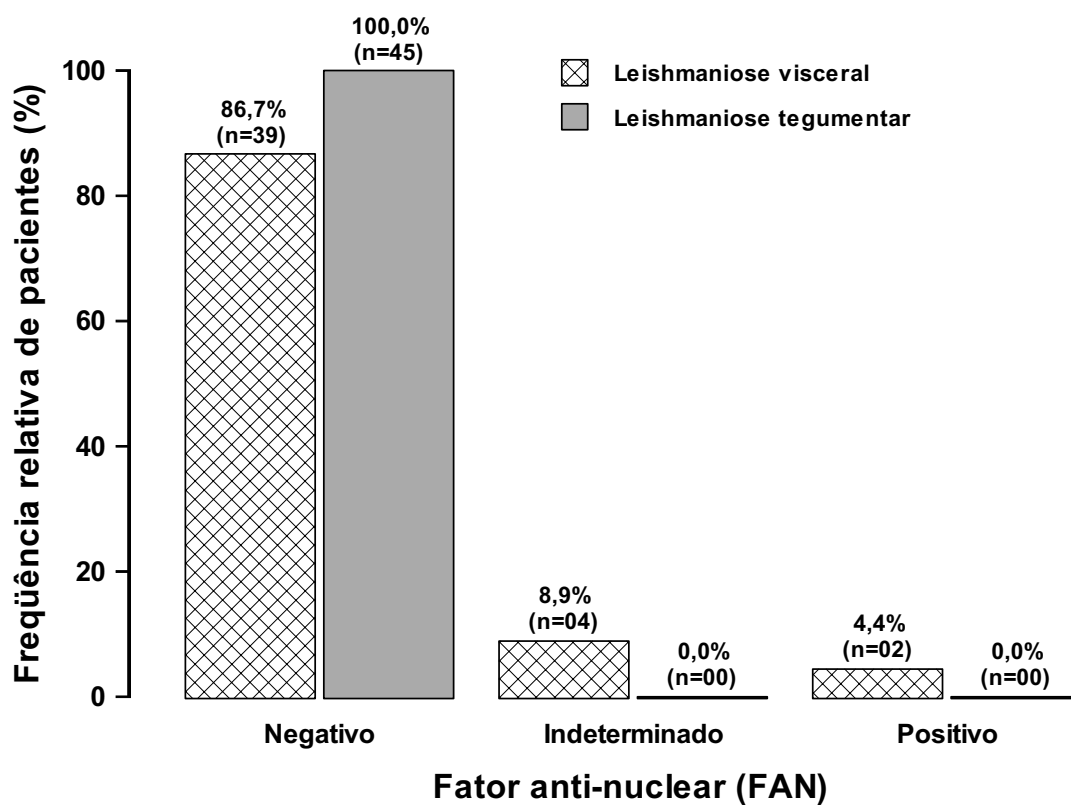


Figura 3 - Frequência relativa de pacientes com leishmaniose, em relação ao Fator anti-nuclear (FAN). Cada coluna representa o valor percentual.

6.5 Anticorpo anti-DNA ds

Entre os pacientes com leishmaniose visceral (n=45), 93,3% (n=42) apresentaram anticorpo anti-DNA ds negativo, 2,2% (n=01) com anticorpo anti-DNA indeterminado e 4,5% (n=02) com anticorpo anti-DNA positivo. Já entre os pacientes com leishmaniose tegumentar, todos (100,0% - n=45) apresentaram anticorpo anti-DNA negativo. Não houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e o resultado do anticorpo anti-DNA (teste do qui-quadrado, $p=0,21$).

6.6 Anticorpo anti-Sm

Todos os pacientes avaliados neste estudo (100,0% - n=90), independentemente do tipo de leishmaniose (visceral ou tegumentar) apresentaram anticorpo anti-Sm negativo. Não houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e o resultado do anticorpo anti-Sm (teste exato de Fisher, $p=1,00$).

6.7 Anticorpo anti-RNP

Em relação ao anticorpo anti-RNP, de todos os pacientes avaliados neste estudo, apenas um (1,1%), com leishmaniose visceral, apresentou um valor indeterminado, sendo que para os demais (98,9% - n=89) o teste foi considerado negativo. Não houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e o resultado do anticorpo anti-RNP (teste exato de Fisher, $p=1,00$).

6.8 Anticorpo anti-Ro (SSA)

Todos os pacientes avaliados neste estudo (100,0% - n=90), independentemente do tipo de leishmaniose (visceral ou tegumentar) apresentaram anticorpo anti-SSA negativo. Não

houve uma relação significativa entre o tipo de Leishmaniose e o resultado do anticorpo anti-SSA (teste exato de Fisher, $p=1,00$).

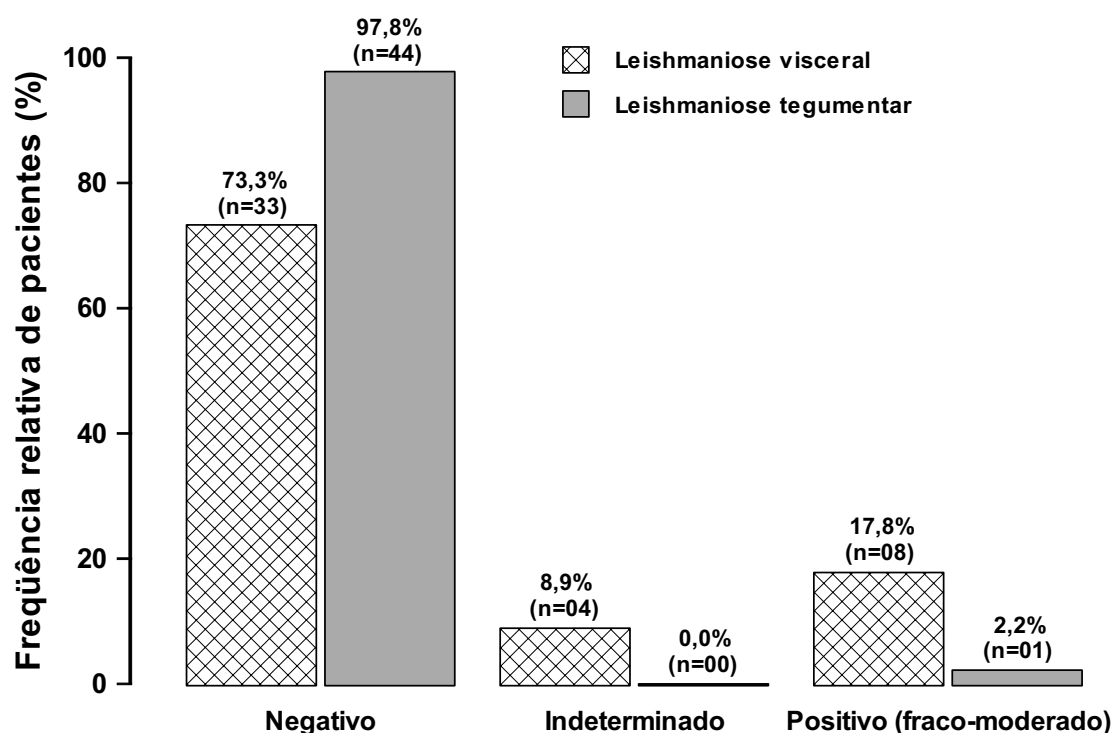
6.9 Anticorpo anti-La (SSB)

Para o anticorpo anti-SSB, apenas um paciente (1,1%), com leishmaniose visceral, apresentou um valor positivo, sendo que para os demais (98,9% - $n=89$) o teste foi considerado negativo. Não houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e o resultado do anticorpo anti-SSB (teste exato de Fisher, $p=1,00$).

6.10 Anticorpo anti-cardiolipina IgM e IgG

Entre os pacientes com leishmaniose visceral ($n=45$), 93,3% ($n=42$) apresentaram anticorpo anti-cardiolipina do tipo IgM (ACL IgM) negativo e 6,7% ($n=03$) apresentaram ACL IgM positivo. Já entre os pacientes com leishmaniose tegumentar, todos (100,0% - $n=45$) apresentaram ACL IgM negativo. Não houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e o resultado do anticorpo anti-cardiolipina do tipo IgM (teste exato de Fisher, $p=0,12$).

Dos 45 pacientes com leishmaniose visceral, 73,3% ($n=33$) apresentaram anticorpo anti-cardiolipina do tipo IgG (ACL IgG) negativo, 8,9% ($n=04$) apresentaram ACL IgG indeterminado e 17,8% ($n=08$) apresentavam ACL IgG positivo. Já entre os pacientes com leishmaniose tegumentar, apenas um (2,2%) apresentou ACL IgG positivo, sendo que para os demais (97,8% - $n=44$) a dosagem de ACL IgG foi considerada negativa. Houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e o resultado do anticorpo anti-cardiolipina do tipo IgG (teste do qui-quadrado, $p=0,004$). Estes resultados estão ilustrados na figura 4.



Anticorpo anti-cardiolipina IgG

Figura 4 - Frequência relativa de pacientes com leishmaniose, em relação ao anticorpo anti-cardiolipina IgG. Cada coluna representa o valor percentual.

6.11 Fator Reumatóide (FR)

Entre os pacientes com leishmaniose visceral (n=45), 75,6% (n=34) apresentavam fator reumatóide (FR) negativo e 24,4% (n=11) apresentavam FR positivo. Já entre os pacientes com leishmaniose tegumentar, 91,1% (n=41) apresentavam FR negativo e 8,9% (n=04) apresentavam FR positivo. Não houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e o resultado para o fator reumatóide (teste exato de Fisher, $p=0,09$).

6.12 Dosagem de complemento C3 e C4

Entre os pacientes com leishmaniose visceral (n=45), 86,7% (n=39) apresentaram concentração de Complemento C3 maior ou igual a 90 mg/dl e 13,3% (n=06) apresentaram concentração de Complemento C3 menor do que 90 mg/dl. Já entre os pacientes com leishmaniose tegumentar, todos (100,0% - n=45) apresentaram Complemento C3 maior ou igual a 90 mg/dl. Houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e a concentração de Complemento C3 (teste exato de Fisher, $p=0,01$), sendo o percentual de pacientes portadores de leishmaniose visceral com concentração de Complemento C3 menor do que 90 mg/dl significativamente maior do que o daqueles portadores de leishmaniose tegumentar (teste z, $p=0,03$). Estes resultados estão ilustrados na figura 5.

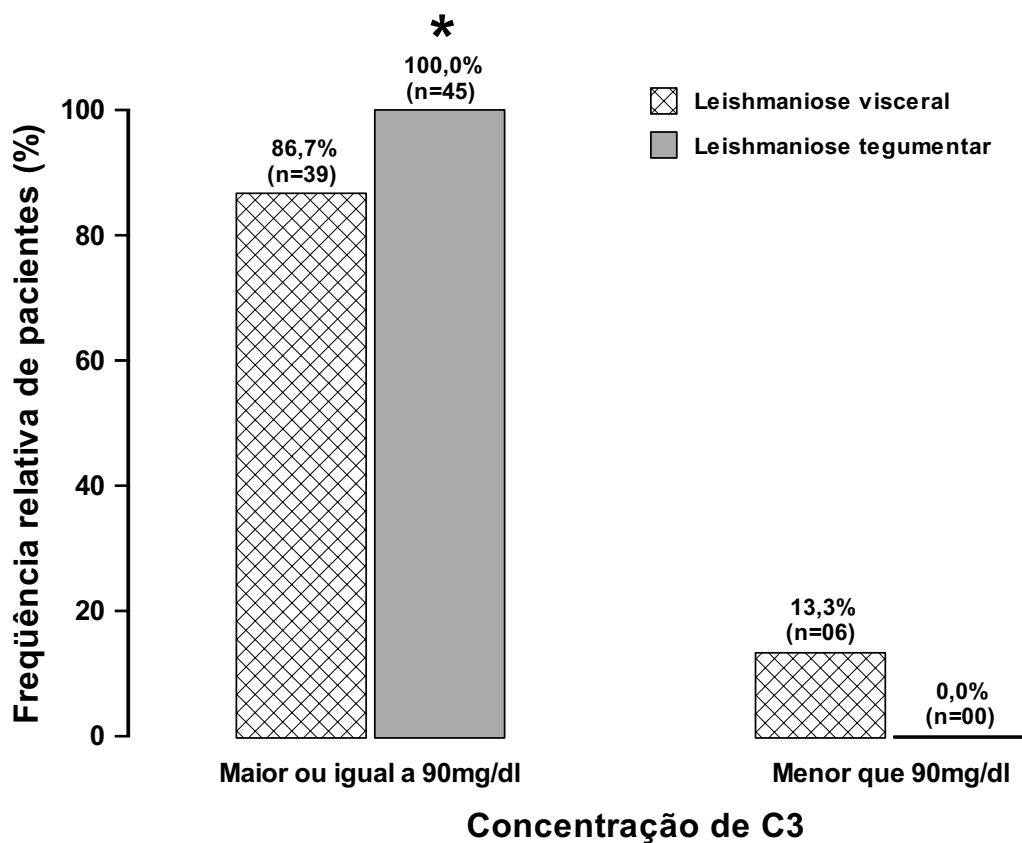


Figura 5 - Frequência relativa de pacientes com leishmaniose, em relação à concentração de Complemento C3. Cada coluna representa o valor percentual. * Diferença significativa em relação aos pacientes com leishmaniose visceral (teste z, $p=0,03$).

Entre os pacientes portadores de leishmaniose visceral, a concentração de Complemento C3 foi de $126,54 \pm 35,15$ mg/dl, enquanto que para os pacientes portadores de leishmaniose tegumentar ela foi de $121,78 \pm 6,53$ mg/dl. Não houve diferença significativa na concentração média de Complemento C3, na comparação entre os pacientes com leishmaniose visceral e aqueles com leishmaniose tegumentar (teste de Mann-Whitney, $p=0,29$).

Nenhum dos pacientes avaliados neste estudo, independente do tipo de leishmaniose, apresentou concentração de Complemento C4 menor do que 10 mg/dl. Os dados referentes à frequência relativa e absoluta de pacientes com leishmaniose visceral e tegumentar, de acordo com as variáveis avaliadas neste estudo, estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Entre os pacientes portadores de leishmaniose visceral, a concentração de Complemento C4 foi de $30,82 \pm 13,46$ mg/dl, enquanto que para os pacientes portadores de leishmaniose tegumentar ela foi de $29,77 \pm 3,63$ mg/dl. Não houve diferença significativa na concentração média de Complemento C4, na comparação entre os pacientes com leishmaniose visceral e aqueles com leishmaniose tegumentar (teste de Mann-Whitney, $p=0,81$).

Tabela 2 - Frequência relativa e absoluta de pacientes com leishmaniose visceral e tegumentar, de acordo com as variáveis avaliadas neste estudo.

Variável	Leishmaniose		Valor de “p”
	Visceral	Tegumentar	
Sexo			
Feminino	48,9% (n=22)*	51,1% (n=23)	1,00 ¹ NS
Masculino	51,1% (n=23)	48,9% (n=22)	
Micro-região			
Campo Grande	62,2% (n=28)	68,9% (n=31)	0,52 ¹ NS
Outra	37,8% (n=17)	31,1% (n=14)	
Anticorpo anti-<i>Leishmania</i>			
Negativo	0,0% (n=00)	37,8% (n=17)	<0,001 ¹ Sig.
Positivo	100,0% (n=45)	62,2% (n=28)	
Fator anti-nuclear (FAN)			
Negativo	86,7% (n=39)	100,0% (n=45)	0,04 ² Sig.
Indeterminado	8,9% (n=04)	0,0% (n=00)	
Positivo	4,4% (n=02)	0,0% (n=00)	
Fator reumatóide			
Negativo	75,6% (n=34)	91,1% (n=41)	0,09 ¹ NS
Positivo	24,4% (n=11)	8,9% (n=04)	
Concentração de Complemento C3			
≥ 90mg/dl	86,7% (n=39)	100,0% (n=45)	0,01 ¹ Sig.
< 90mg/dl	13,3% (n=06)	0,0% (n=00)	
Concentração de Complemento C4			
≥ 10mg/dl	100,0% (n=45)	100,0% (n=45)	1,00 ¹ NS
< 10mg/dl	0,0% (n=00)	0,0% (n=00)	

* Frequência relativa (frequência absoluta); NS=relação não significativa; Sig.=relação significativa; ¹ Valor de "p" no teste exato de Fisher; ² Valor de "p" no teste do qui-quadrado.

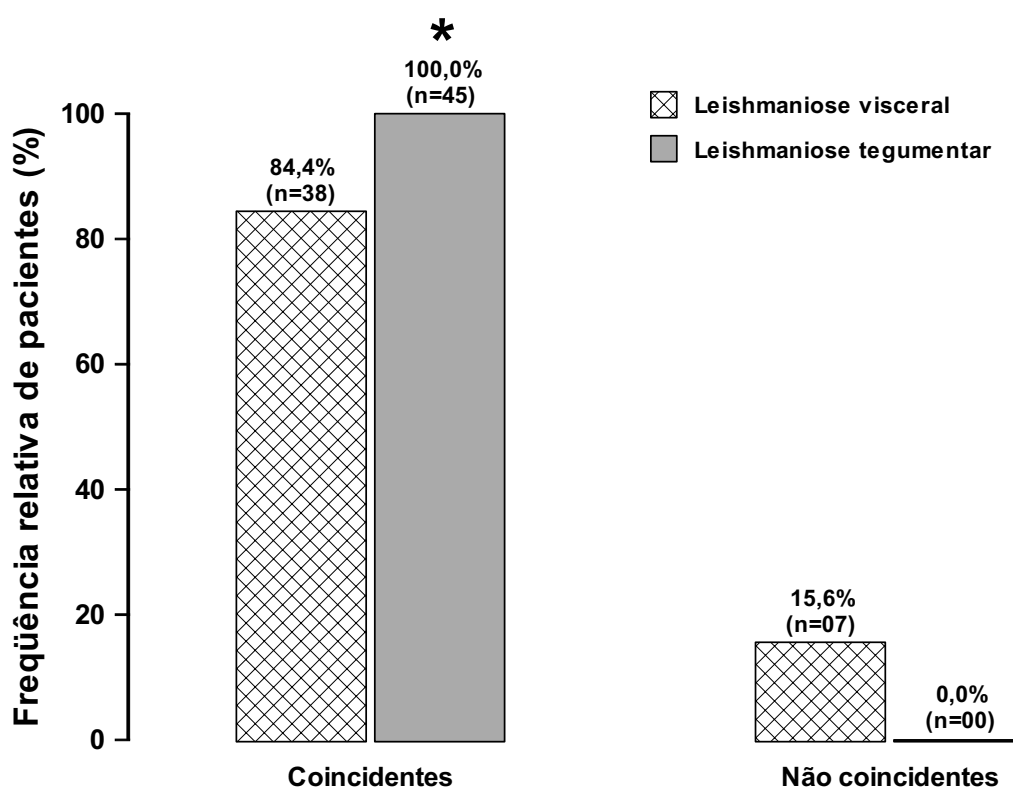
Tabela 3 - Frequência relativa e absoluta de pacientes com leishmaniose visceral e tegumentar, de acordo com os auto-anticorpos avaliados neste estudo.

Variável	Leishmaniose		Valor de “p”
	Visceral	Tegumentar	
Fator anti-DNA			
Negativo	93,3% (n=42)	100,0% (n=45)	0,21 ² NS
Indeterminado	2,2% (n=01)	0,0% (n=00)	
Positivo	4,4% (n=02)	0,0% (n=00)	
Anticorpo anti-Sm			
Negativo	100,0% (n=45)	100,0% (n=45)	1,00 ¹ NS
Positivo	0,0% (n=00)	0,0% (n=00)	
Anticorpo anti-RNP			
Negativo	97,8% (n=44)	100,0% (n=45)	1,00 ¹ NS
Positivo	2,2% (n=01)	0,0% (n=00)	
Anticorpo anti-SSA			
Negativo	100,0% (n=45)	100,0% (n=45)	1,00 ¹ NS
Positivo	0,0% (n=00)	0,0% (n=00)	
Anticorpo anti-SSB			
Negativo	97,8% (n=44)	100,0% (n=45)	1,00 ¹ NS
Positivo	2,2% (n=01)	0,0% (n=00)	
Anticorpo anti-cardiolipina IgM			
Negativo	93,3% (n=42)	100,0% (n=45)	0,12 ¹ NS
Positivo	6,7% (n=03)	0,0% (n=00)	
Anticorpo anti-cardiolipina IgG			
Negativo	73,3% (n=33)	97,8% (n=44)	0,004 ² Sig.
Indeterminado	8,9% (n=04)	0,0% (n=00)	
Positivo	17,8% (n=08)	2,2% (n=01)	

* Frequência relativa (frequência absoluta); NS=relação não significativa; Sig.=relação significativa; ¹ Valor de "p" no teste exato de Fisher; ² Valor de "p" no teste do qui-quadrado.

6.13 Fatores de Concordância entre o FAN e outros testes

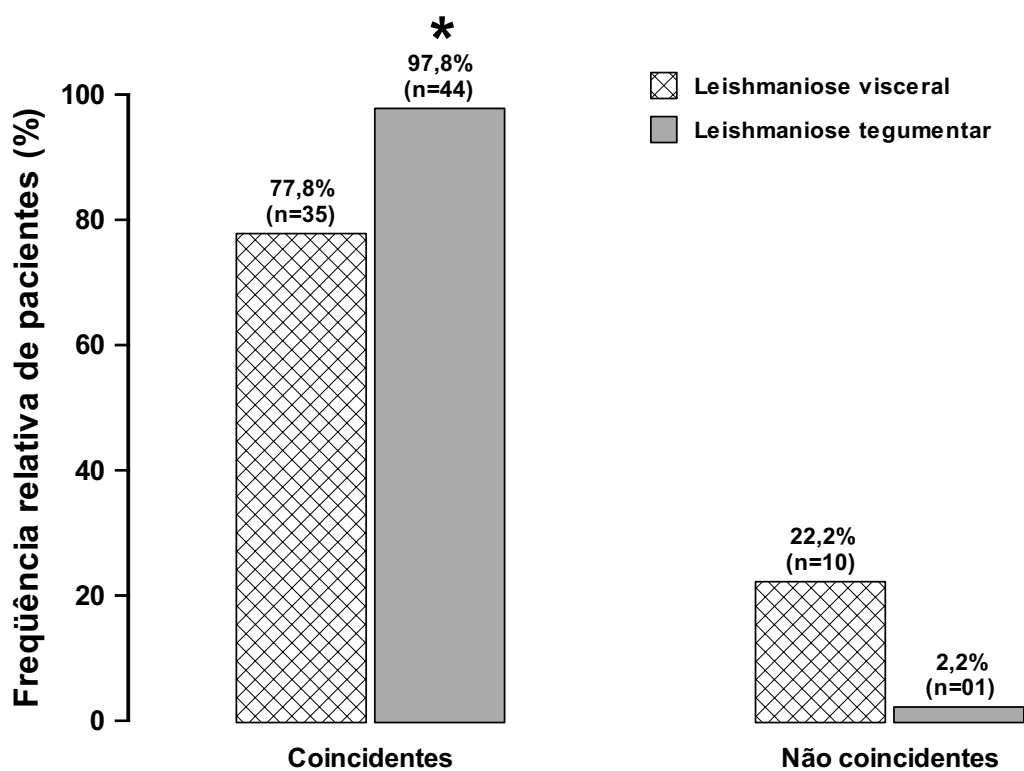
Entre os pacientes portadores de leishmaniose visceral, houve uma correlação entre o resultado observado no teste do fator anti-nuclear (FAN) e aquele observado no teste ACL IgM em 84,4% (n=38) dos casos, e não houve correlação em 15,6% (n=07) dos casos. Já para os pacientes portadores de leishmaniose tegumentar, a correlação entre ambos os testes foi de 100,0% (n=45) dos casos. Houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e a correlação nos resultados entre o teste do fator anti-nuclear (FAN) e o teste do ACL IgM (teste exato de Fisher, $p=0,006$), sendo, o percentual de correlação entre os resultados dos testes, maior entre os pacientes portadores de leishmaniose tegumentar do que aquele observado para os pacientes portadores de leishmaniose visceral (teste z, $p=0,02$). Estes resultados estão ilustrados na figura 6.



Resultados entre FAN e ACL IgM

Figura 6 - Frequência relativa de pacientes com leishmaniose, em relação aos resultados entre Fator anti-nuclear (FAN) e o anticorpo anti-cardiolipina do tipo IgM (ACL IgM). Cada coluna representa o valor percentual. * Diferença significativa em relação aos pacientes com leishmaniose visceral (teste z, $p=0,02$).

Entre os pacientes portadores de leishmaniose visceral, houve uma correlação entre o resultado observado no teste do fator anti-nuclear (FAN) e aquele observado no teste ACL IgG em 77,8% (n=35) dos casos, e não houve correlação em 22,2% (n=10) dos casos. Já para os pacientes portadores de leishmaniose tegumentar, a correlação entre ambos os testes foi de 97,8% (n=44) dos casos, e não houve correlação em apenas um caso (2,2%). Houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e a correlação nos resultados entre o teste do fator anti-nuclear (FAN) e o teste do ACL IgG (teste exato de Fisher, $p=0,007$), sendo, o percentual de correlação entre os resultados testes, maior entre os pacientes portadores de leishmaniose tegumentar do que aquele observado para os pacientes portadores de leishmaniose visceral (teste z, $p=0,01$). Estes resultados estão ilustrados na figura 7.

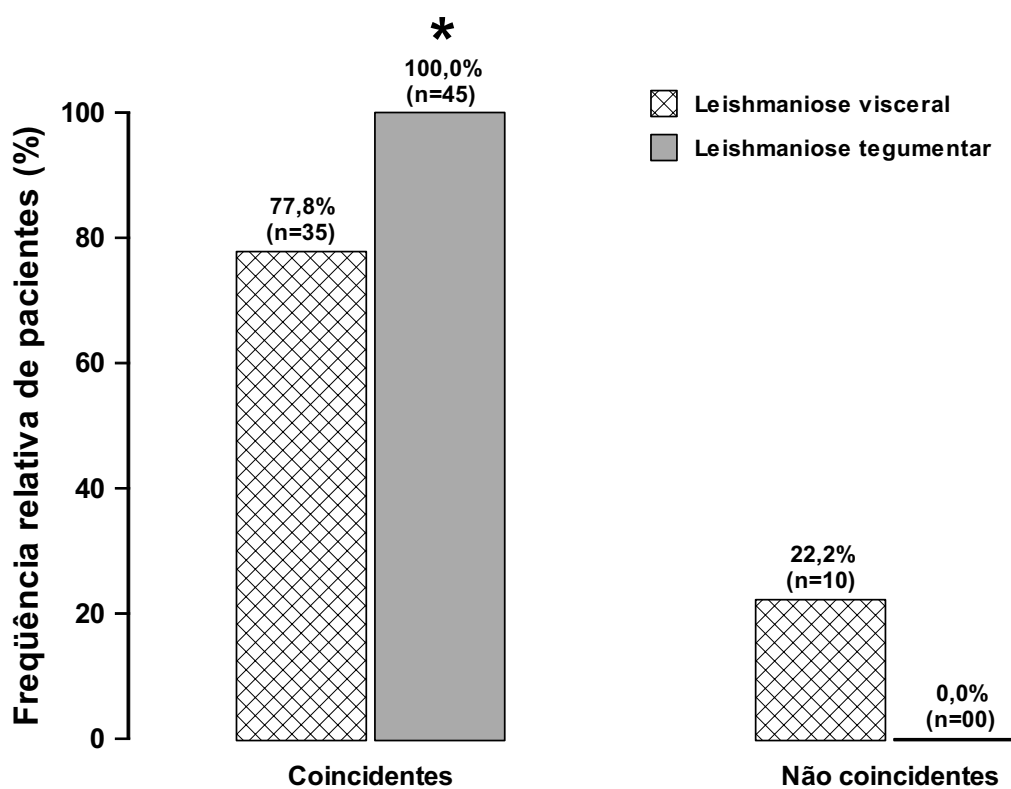


Resultados entre FAN e ACL IgG

Figura 7 - Frequência relativa de pacientes com leishmaniose, em relação aos resultados entre Fator anti-nuclear (FAN) e o anticorpo anti-cardiolipina do tipo IgG (ACL IgG). Cada coluna representa o valor percentual. * Diferença significativa em relação aos pacientes com leishmaniose visceral (teste z, $p=0,01$).

Entre os pacientes portadores de leishmaniose visceral, houve uma correlação entre o resultado observado no teste do fator anti-nuclear (FAN) e aquele observado no teste do fator reumatóide (FR) em 77,8% (n=35) dos casos, e não houve correlação em 22,2% (n=10) dos casos. Já para os pacientes portadores de leishmaniose tegumentar, a correlação entre ambos os testes foi de 91,1% (n=41) dos casos, e não houve correlação em 8,9% (n=04) dos casos. Não houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e a correlação nos resultados entre o teste do fator anti-nuclear (FAN) e o teste do fator reumatóide (teste exato de Fisher, $p=0,14$).

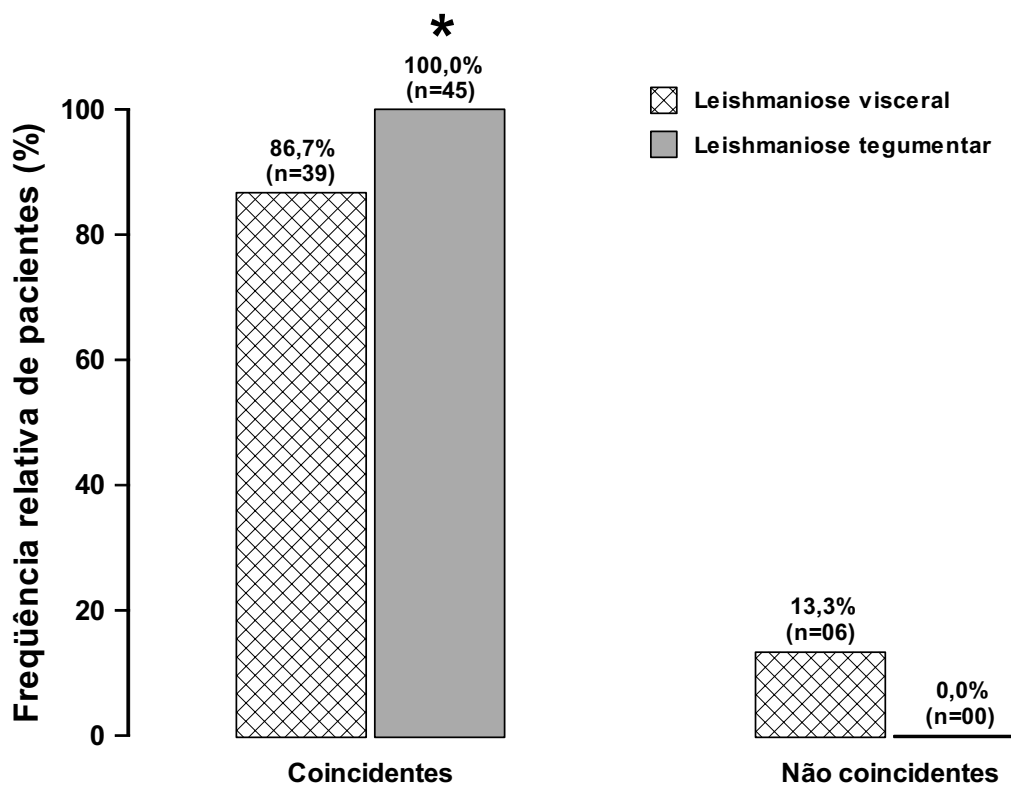
Entre os pacientes portadores de leishmaniose visceral, houve uma correlação entre o resultado observado no teste do fator anti-nuclear (FAN) e aquele observado no teste do Complemento C3 em 77,8% (n=35) dos casos, e não houve correlação em 22,2% (n=10) dos casos. Já para os pacientes portadores de leishmaniose tegumentar, a correlação entre ambos os testes foi de 100,0% (n=45) dos casos. Houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e a correlação nos resultados entre o teste do fator anti-nuclear (FAN) e o teste do Complemento C3 (teste exato de Fisher, $p<0,001$), sendo, o percentual de correlação entre os resultados testes, maior entre os pacientes portadores de leishmaniose tegumentar do que aquele observado para os pacientes portadores de leishmaniose visceral (teste z, $p=0,003$). Estes resultados estão ilustrados na figura 8.



Resultados entre FAN e C3

Figura 8 - Frequência relativa de pacientes com leishmaniose, em relação aos resultados entre Fator anti-nuclear (FAN) e Complemento C3. Cada coluna representa o valor percentual. * Diferença significativa em relação aos pacientes com leishmaniose visceral (teste z, $p=0,003$).

Entre os pacientes portadores de leishmaniose visceral, houve uma correlação entre o resultado observado no teste do fator anti-nuclear (FAN) e aquele observado no teste do Complemento C4 em 86,7% (n=39) dos casos, e não houve correlação em 13,3% (n=06) dos casos. Já para os pacientes portadores de leishmaniose tegumentar, a correlação entre ambos os testes foi de 100,0% (n=45) dos casos. Houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e a correlação nos resultados entre o teste do fator anti-nuclear (FAN) e o teste do Complemento C4 (teste exato de Fisher, $p=0,01$), sendo, o percentual de correlação entre os resultados dos testes, maior entre os pacientes portadores de leishmaniose tegumentar do que aquele observado para os pacientes portadores de leishmaniose visceral (teste z, $p=0,03$). Estes resultados estão ilustrados na figura 9. Os dados referentes à frequência relativa e absoluta de pacientes com leishmaniose visceral e tegumentar, de acordo com o resultado entre o teste FAN e outros testes, estão apresentados na tabela 4.



Resultados entre FAN e C4

Figura 9 - Frequência relativa de pacientes com leishmaniose, em relação aos resultados entre Fator anti-nuclear (FAN) e Complemento C4. Cada coluna representa o valor percentual. * Diferença significativa em relação aos pacientes com leishmaniose visceral (teste z, $p=0,03$).

Tabela 4 - Frequência relativa e absoluta de pacientes com leishmaniose, de acordo com o resultado entre o teste FAN e outros testes.

Resultados entre Testes	Leishmaniose		Valor de “p”
	Visceral	Tegumentar	
FAN e ACL IgM			
Coincidentes	84,4% (n=38)	100,0% (n=45)	0,006 ¹ Sig.
Não coincidentes	15,6% (n=07)	0,0% (n=00)	
FAN e ACL IgG			
Coincidentes	77,8% (n=35)	97,8% (n=44)	0,007 ¹ Sig.
Não coincidentes	22,2% (n=10)	2,2% (n=01)	
FAN e Fator reumatóide			
Coincidentes	77,8% (n=35)	91,1% (n=41)	0,14 ¹ NS
Não coincidentes	22,2% (n=10)	8,9% (n=04)	
FAN e Complemento C3			
Coincidentes	77,8% (n=35)	100,0% (n=45)	<0,001 ¹ Sig.
Não coincidentes	22,2% (n=10)	0,0% (n=00)	
FAN e Complemento C4			
Coincidentes	86,7% (n=39)	100,0% (n=45)	0,01 ¹ Sig.
Não coincidentes	13,3% (n=06)	0,0% (n=00)	

* Frequência relativa (frequência absoluta); NS=relação não significativa; Sig.=relação significativa; ¹ Valor de "p" no teste exato de Fisher.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, procurou-se minimizar a ocorrência de viés de seleção através da avaliação de uma amostragem média (90 pacientes) e população estatisticamente semelhante, sendo que metade eram portadores de leishmaniose visceral e a outra metade, de leishmaniose tegumentar. Desse modo foi possível observar a produção de auto-anticorpos e complemento em cada uma das formas da doença, sem outros fatores de interferência.

Não houve diferença significativa entre os pacientes portadores de leishmaniose visceral e aqueles com leishmaniose tegumentar em relação à idade ou o sexo neste trabalho, sendo que a idade média encontrada foi de 35,43 anos e aproximadamente metade dos pacientes de cada sexo. Fernandes (1990) observou incidência de 53 casos de leishmaniose cutâneo-mucosa na região de Nioaque (MS) durante o período de agosto de 1987 a julho de 1988, sendo que destes, ocorreu predomínio na população jovem, menor de 20 anos de idade (37,7%) e o mesmo autor também não encontrou predomínio em relação ao sexo dos indivíduos afetados¹³⁸.

Nunes et al. (1995), em estudo epidemiológico sobre leishmaniose tegumentar na região de Corguinho (MS), encontraram a faixa etária mais atingida pela parasitose entre 22 a 78 anos, com predomínio de homens (75% dos casos)¹³⁹.

Oliveira et al. (2006) estudando 149 casos de leishmaniose visceral no município de Três Lagoas (MS) durante período de 2000 a 2003, encontraram predominância da faixa etária de 0 a 4 anos (28,2%), seguida pela de 30 a 60 anos (27,5%). Em relação ao sexo, os mesmos autores encontraram predomínio do sexo masculino em 71,1% dos casos³⁵.

Em relação ao sexo, a literatura destaca o masculino como o mais susceptível à leishmaniose visceral e tegumentar, possivelmente devido aos hábitos recreativos e ocupacionais deste grupo, cujos indivíduos têm maior tendência de adentrar nas matas silvestres e se expor ao habitat natural dos flebotomíneos^{140 141 142}. Corroborando esta observação, Dorval et al. (2006) relataram nove casos de leishmaniose tegumentar americana em homens militares, ocorridos em uma unidade de treinamento militar localizada no município de Bela Vista (MS), os quais desenvolviam treinamento em contato direto com o solo e pernoitavam na mata¹⁴³.

Por outro lado, tem-se observado recentemente uma mudança no padrão de ocorrência da leishmaniose no Estado e no país, com expansão e importante urbanização da doença, o que pode contribuir para exposição equivalente de ambos os sexos à doença³⁴.

As micro-regiões do Estado encontradas mais freqüentemente, com relação à procedência dos pacientes do estudo, estão em consonância com os dados da Secretaria de Saúde do Estado de Mato Grosso do Sul, que apontaram a ocorrência de leishmaniose visceral principalmente nos municípios de Campo Grande, Três Lagoas e Aquidauana durante o período de 2003 a 2007³⁶.

No presente estudo, todos os pacientes que eram portadores de leishmaniose visceral apresentavam titulação de anticorpo anti-*Leishmania* positiva ($>1/80$). Com relação aos portadores de leishmaniose tegumentar, 37,8% dos pacientes apresentavam anticorpos anti-*Leishmania* negativa e 62,2% deles apresentavam positividade dos anticorpos. Schubach et al encontraram 52,5% de positividade em anticorpos anti-*Leishmania* em pacientes com doença cutânea ativa¹³². Já Silveira et al encontraram 64,4% de positividade em 955 pacientes com diagnóstico laboratorial positivo para leishmaniose cutânea¹⁴⁰. Atta et al estudando pacientes com leishmaniose visceral, também encontrou positividade em 100% dos mesmos, no entanto apresentou amostragem baixa de 9 pacientes¹¹⁴. Pappas et al., em amostra de 42 pacientes, encontrou sorologia positiva em 98% dos pacientes com leishmaniose visceral¹¹⁹. Na literatura, o encontro de sorologia positiva anti-*Leishmania* predominante nos casos da forma visceral, pode ser explicado pela evidência do padrão de resposta Th2 da doença, com ativação policlonal de linfócitos B e produção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* e anticorpos com outras especificidades^{114 109}.

Entre os pacientes com leishmaniose visceral encontrou-se fator anti-nuclear (FAN) indeterminado em 8,9% dos casos, e positivo em 4,4% dos pacientes (com titulação maior que 1/160). Não se encontrou na literatura nenhum outro trabalho comparando a positividade de FAN em pacientes com leishmaniose visceral ou cutânea. Deve-se considerar que 5% da população normal e até 13% da população acima de 50 anos pode ter um teste positivo em título baixo¹³³. Várias possibilidades podem explicar a manifestação de auto-anticorpos na leishmaniose visceral. O mais aceito é que a hipergamaglobulinemia que está presente em praticamente todos os pacientes com leishmaniose visceral, decorrente da grande produção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA por ativação policlonal dos linfócitos B, ocasionando a formação de anticorpos específicos e auto-anticorpos que estão expressos em baixos níveis

sob condições normais²⁶. Existe evidência que antígenos solúveis derivados do parasita de *Leishmania major* e *L. donovani* são mitogênicos e desencadeiam a produção de imunoglobulinas com atividade de auto-anticorpos²⁶.

Encontrou-se no estudo a presença de anticorpo anti-DNA ds indeterminado em 2,2% dos casos e positivo em 4,4% dos pacientes com leishmaniose visceral. Não houve uma relação significativa entre o tipo de leishmaniose e o resultado do anticorpo anti-DNA. No entanto, o resultado mesmo que não significativo do ponto de vista estatístico, é muito relevante do ponto de vista diagnóstico, pois é amplamente difundido que o anticorpo anti-DNA dupla hélice é quase exclusivo de pacientes com diagnóstico de LES e muito raro em pessoas normais¹⁴⁴. Na fase de auto-imunidade patogênica inclusive, o aparecimento de anti-DNA se correlaciona com o surgimento de sinais e sintomas no paciente que levam à apresentação clínica e ao diagnóstico¹⁴⁴. O resultado pode ser explicado pela reatividade cruzada dos anticorpos anti-DNA, que pode ocorrer quando se realiza a detecção do anticorpo pela técnica de IFI com *Crithidia luciliae*. Observa-se positividade do teste em pacientes com leishmaniose, com formação de imagens atípicas e fluorescência em outras estruturas do parasita¹⁴⁵.

Granel et al. (2000) relataram caso de paciente com leishmaniose visceral que apresentava anti-DNA dupla hélice positiva, o qual desapareceu após tratamento com esteróides, antimoniais e posterior uso de anfotericina B lipossomal²⁷. Argov et al. (1989) estudando 23 pacientes com leishmaniose visceral e 14 pacientes com leishmaniose cutânea, não encontraram positividade de anti-DNA nos mesmos, apesar da produção de outros auto-anticorpos nestes pacientes²⁶.

Todos os pacientes avaliados neste estudo, independentemente do tipo de leishmaniose (visceral ou tegumentar) apresentavam anticorpo anti-Sm negativo. Surpreendentemente, Argov et al. (1989) encontraram positividade de anti-Sm em 7% dos pacientes com leishmaniose cutânea e 83% dos pacientes com leishmaniose visceral²⁶. Os soros dos pacientes eram provenientes da América do Sul (predominantemente Brasil), África e Ásia (principalmente da Índia). Mimetismo molecular entre antígenos da *Leishmania sp.* e ribonucleoproteínas é uma outra hipótese levantada por Granel et al (2000), para explicar a ocorrência destes auto-anticorpos (anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA e anti-SSB) em pacientes infectados²⁷. A possibilidade que determinantes antigênicos sejam compartilhados entre Sm,

RNP, SSB e a *Leishmania*, é levantada pela inibição de auto-anticorpos para estes antígenos nucleares por promastigotas intactas de *Leishmania*²⁶.

Em relação ao anticorpo anti-RNP, entre os pacientes avaliados neste estudo, apenas um (1,1%), com leishmaniose visceral, apresentou um valor indeterminado, sendo que para os demais o teste foi considerado negativo. Argov et al. (1989) encontraram positividade de anti-RNP em 14% dos pacientes com leishmaniose cutânea e 86% dos pacientes com leishmaniose visceral²⁶.

Todos os pacientes avaliados neste estudo, independentemente do tipo de leishmaniose (visceral ou tegumentar) apresentavam anticorpo anti-SSA negativo. Para o anticorpo anti-SSB, apenas um paciente (1,1%), com leishmaniose visceral, apresentou um valor positivo, sendo que para os demais o teste foi considerado negativo. Argov et al. (1989) encontraram positividade de anti-SSA e anti-SSB em 25% dos pacientes com leishmaniose cutânea e, respectivamente em 36% e 73% dos pacientes com leishmaniose visceral²⁶.

Entre os pacientes com leishmaniose visceral 6,7% apresentavam anticorpo anti-cardiolipina do tipo IgM (ACL IgM) positivo. No mesmo grupo, encontrou-se ainda positividade do anticorpo anti-cardiolipina do tipo IgG (ACL IgG) em 17,8% dos casos. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo com os anticorpos anti-cardiolipina para comparação. São relatados na literatura a presença de anticorpos anti-cardiolipina em outras doenças infecciosas¹⁴⁶. Repka et al. (2001) encontraram tais anticorpos em 8,34% dos pacientes com hanseníase paucibacilar, além de positividade em 80,77% dos pacientes multibacilares não tratados¹⁴⁷. A origem da presença dos anticorpos anti-cardiolipina em pacientes com infecção tem sido debatida e várias hipóteses foram aventadas, entre as quais: que se deva à ativação policlonal inespecífica de célula B; que o agente infeccioso tenha a capacidade de se ligar aos fosfolípidos endógenos tornando-os imunogênicos; que o agente infeccioso produza dano endotelial expondo epítomos de fosfolípidos que desencadearão a resposta imunológica; que o aparecimento do anticorpo anti-cardiolipina se deva à reação cruzada com anticorpos anti-DNA ds presentes; que os anticorpos anti-cardiolipina resultem de uma reação cruzada com os próprios antígenos do agente infectante; que os anticorpos anti-cardiolipina apareçam para atuar como agente de depuração, num processo adaptativo do organismo em resposta a danos tissulares^{146 147}.

A importância do achado de anticorpos anti-cardiolipina em pacientes com leishmaniose se deve ao fato dos auto-anticorpos estarem relacionados com mecanismos

etiopatogênicos de trombose venosa e arterial¹⁴⁶. Terrazzano et al. em 2006, estudaram 33 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e encontraram em 63,3% deles a presença de anticorpos anti-plaquetas, sendo que a metade destes apresentava trombocitopenia e sinais clínicos de doença moderada a severa¹⁴⁸.

Entre os pacientes com leishmaniose visceral 24,4% apresentavam fator reumatóide (FR) positivo e 8,9% dos pacientes com leishmaniose tegumentar apresentavam FR positivo. Estes auto-anticorpos são mais freqüentemente encontrados em Artrite reumatóide (AR), mas podem ser observados em outras doenças auto-imunes, bem como em algumas infecções, como por exemplo leishmaniose. O FR de pacientes com AR difere do anticorpo IgM anti-IgG que é encontrado em doenças infecciosas¹⁴⁹.

Chabanne et al. (1993) detectaram fator reumatóide IgM e IgA por método de ELISA em altos títulos em cães com leishmaniose visceral, respectivamente 45% e 30%³⁰.

Atta et al. (2007) encontraram altos níveis de fator reumatóide IgM (100Ui/ml) em 90% dos pacientes estudados com leishmaniose visceral. Surpreendentemente, também foi encontrado anticorpo IgG anti-CCP (citrulina) em 30% dos mesmos pacientes. Acredita-se que estes anticorpos tenham alta especificidade diagnóstica para AR e atualmente são usados como bons preditivos de AR precoce. Esta produção de anticorpos anti-CCP poderia ser causada pela citrulinização de proteínas do hospedeiro durante infecção por *Leishmania* e poderia representar um novo aspecto da imunopatogênese da leishmaniose visceral¹⁴⁹.

Relata-se na literatura a presença de altos níveis de imunocomplexos circulantes em pacientes com leishmaniose visceral e LES^{28 29}. Sinais de ativação da cascata do complemento foram observados em estudo de pacientes com leishmaniose visceral, em 43,4% dos casos havia queda simultânea das frações C3 e C4, além de alteração no teste CH100, sugerindo ativação da via clássica²⁴.

Contrariamente ao trabalho citado, no estudo presente encontrou-se queda somente da fração C3 de complemento em pacientes com leishmaniose visceral, que sugere ativação da via alternativa¹⁵⁰. Corroborando estes dados, Stebut (2007) encontrou ativação do sistema de complemento em modelos experimentais de leishmaniose, principalmente pela opsonização da superfície do parasita com C3b¹⁵¹.

Sabe-se que alguns patógenos intracelulares utilizam-se de moléculas regulatórias e receptores do complemento como um meio de entrar nas células, como a *Leishmania*, que desenvolve mecanismos para promover sua própria fagocitose, promovendo consumo de

frações do complemento^{151 152}. Um outro mecanismo envolvido no consumo de complemento na leishmaniose pode ser atribuído à liberação de antígenos seqüestrados durante agressão tecidual e rompimento de células do hospedeiro, com exposição de antígenos previamente ocultos e ativação do complemento²⁷.

8. CONCLUSÃO

Conclui-se desse modo que:

- a- Os auto-anticorpos estatisticamente significantes, presentes em pacientes com leishmaniose visceral, foram: FAN positivo (4,4%) ou em baixa titulação (8,9%) e anticorpo anti-cardiolipina do tipo IgG positivo (17,8%) ou indeterminado (8,9%). Encontrou-se, além disso, diminuição do complemento sérico C3 em 17,8% dos pacientes e anticorpos anti-*Leishmania* >1/80 positivos em todos os pacientes com leishmaniose visceral.
- b- Na leishmaniose tegumentar não se encontraram alterações significantes com relação à frequência de auto-anticorpos ou dosagem de complemento.
- c- As características dos pacientes com leishmaniose visceral e tegumentar, no que se refere aos dados de identificação, foram idênticas, sendo a idade média de 35,43 anos. Não houve predomínio estatístico em ambos os grupos com relação ao sexo dos pacientes. Em ambas as formas da doença, no que se refere à procedência dos pacientes, encontrou-se predominância da micro-região de Campo Grande em mais de 60% dos casos, sendo que as outras regiões principais de procedência dos pacientes foram: micro-região de Aquidauana (11,1%) e micro-região de Três Lagoas (8,9%).
- d- A forma visceral de leishmaniose pode se correlacionar positivamente com a presença de auto-anticorpos, possivelmente pelo desencadeamento de uma resposta predominantemente humoral do Tipo Th2.
- e- A forma tegumentar de leishmaniose se correlaciona negativamente com a presença de auto-anticorpos, possivelmente pelo desencadeamento de uma resposta predominantemente celular do tipo Th1.

9. REFERÊNCIAS

1. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev. Bras. Epidemiol. 2004;7(3):1-13.
2. Gama MEA, Costa JML, Pereira JCR, Gomes CMC, Corbett CEP. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. Braz. J. Med. Biol. Res. 2004;37:129-36.
3. Belic A, Pejin D, Stefanovic N, Spasojevic J, Durkovic D. Hematologic characteristics of leishmaniasis. Med. Pregl. 2000;53(1-2):89-91.
4. Sato EI. Lúpus Eritematoso Sistêmico. In: Prado F C. Atualização Terapêutica 2001. São Paulo: Artes médicas; 2001. p. 1382-7.
5. Voulgarelis M, Volgari PV, Serelis J, Drosos AA, Skopouli FN. Visceral Leishmaniasis resembling Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Rheumatol. 2003;22(6):452-5.
6. Voulgari PV, Pappas GA, Liberopoulos EN, Elisaf M, Skopouli FN, Drosos AA. Visceral Leishmaniasis resembling Systemic Lupus Erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 2004;63(10):1348-9.
7. Fernández-Guerrero ML, Aguado JM, Buzón L, Barros C, Montalbán C, Martín T, Bouza E. Visceral Leishmaniasis in immunocompromised hosts. Am. J. Med. 1987;83(6):1098-102.
8. Saltoglu N, Tasova Y, Midikli D, Aksu HS, Sanli A, Dündar IH. Fever of unknown origin in Turkey: evaluation of 87 cases during a nine-year-period of study. J. Infect. 2004;48(1):81-5.
9. Wallis PJ, Clark CJ. Visceral Leishmaniasis complicating Systemic Lupus Erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 1983;42(2):201-2.
10. López-Soto A, López R. Síndrome febril, esplenomegalia y pancitopenia em un varón de 23 años com Lupus Eritematoso Sistêmico. Méd. Clin. (Barc.) 1992;98(13):510-5.
11. Capell S, Aranda M, Colome A, López R, Pujol R. Visceral Leishmaniasis. Ann. Rheum. Dis. 1993;52(7):551.
12. Knobloch J, Demar M. Accidental *Leishmania mexicana* infection in an immunosuppressed laboratory technician. Trop. Med. Int. Health. 1997;2(12):1152-5.
13. Ravelli A, Viola S, DE Benedetti F, Magni Manzoni S, Martini A. Visceral Leishmaniasis

as a cause of unexplained fever and cytopenia in Systemic Lupus Erythematosus. *Acta Paediatr.* 2002;91(2):246-7.

14. Arora SK, Singh G, Sehgal S. Comparative evaluation of anti-heat shock protein antibodies in SLE and healthy controls. *Scand. J. Rheumatol.* 1995;24:160-3.

15. Altozano JG, López-Gómez JM, Robles R, Muiño A, Romero J, Valderrábano F. Leishmaniasis Visceral en el Lupus Eritematoso Sistémico. *Med. Clin. (Barc.)* 1987;88(10):417-8.

16. Braun J, Sieper J, Schulte KL, Thiel E, Janitschke K. Visceral Leishmaniasis mimicking a flare of Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Rheumatol.* 1991;10(4):445-8.

17. Guillaud V, Hill MP, Piens MA, Barrut D, Moulin G. Leishmaniose cutanée évoluant pendant 48 ans. *Ann. Dermatol. Venereol.* 1991;118(11):850-1.

18. Paksoy N, Hekim E. Comparative analysis of the clinico pathological features in cutaneous Leishmaniasis and Lupus vulgaris in Turkey. *Trop. Med. Parasitol.* 1993;44(1):37-9.

19. Ysmail-Dahlouk M, Amar Khodja A, Ysmail-Dahlouk S, Ait Belkacem F. Leishmaniose Lupoide. *Ann. Dermatol. Venereol.* 1994;121(2):103-6.

20. Momeni AZ, Yotsumoto S, Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA, Aminjavaheri M, Fujiwara H, Tada J. Chronic Lupoid Leishmaniasis: Evaluation by polymerase chain reaction. *Arch. Dermatol.* 1996;132(2):198-202.

21. Landau M, Srebrnik A, Brenner S. Leishmaniasis recidivans mimicking Lupus vulgaris. *Int. J. Dermatol.* 1996;35(8):572-3.

22. Paradisi M, Grosso MG, Angelo C, Gradoni L, Ludovisi A, N'doni F, Puddu P. Um caso di Leishmaniosi Lupoide in età pediatrica diagnostica mediante PCR. *Minerva Pediatr.* 2001;53(1):33-7.

23. Kaufmann I, Kurz K. Vergleich von Tuberculosis cutis luposa und kutaner Leishmaniase. *Z. Hautkr.* 1985;60(1-2):93-9.

24. Verde EML, Verde FAL, Verde FAAL. Nefropatia do calazar. In: Riella MC. *Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólitos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p. 102-9.

25. Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R, Bonfanti U, Nigrisoli E, Zanatta R, Tarducci A, Guarraci A. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *Amer. J. Vet. Res.* 2003;64(5):558-61.

26. Argov S, Jaffe CL, Krupp M, Slor H, Shoenfeld Y. Autoantibody production by patients infected with *Leishmania*. Clin. Exp. Immunol. 1989;76(2):190-7.
27. Granel B, Serratrice J, Swiader L, Gambarelli F, Daniel L, Fossat C, Hesse-Bonérandi S, Pache X. Crossing of antinuclear antibodies and anti-*Leishmania* antibodies. Lupus. 2000;9(7):548-50.
28. Soares NM, Santiago MB, Pontes Carvalho LC. An improved anti-C3/IgG ELISA for quantification of soluble immune complexes. J. Immunol. Methods. 2001;249(1-2):199-205.
29. Elshafie AI, Ahlin E, Mathsson L, Elghazali G, Ronnelid J. Circulating immune complexes (IC) and IC-induced levels of GM-CSF are increased in Sudanese patients with acute visceral *Leishmania donovani* infection undergoing sodium stibogluconate treatment: implications for disease pathogenesis. J. Immunol. 2007;178:5383-9.
30. Chabanne L, Fournel C, Faure JR, Veyseyre CM, Rigal D, Bringuier JP, Monier JC. IgM and IgA rheumatoid factors in canine polyarthritis. Vet. Immunol. Immunopathol. 1993;39(4):365-79.
31. 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. 182 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
32. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120 p.: ilust. color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
33. Nunes VLB, Yamamoto YY, Rego FA Jr, Dorval MEMC, Galati EAB, Oshiro ET, Rodrigues M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. Pesq. Vet. Bras. 1988;8:17-21.
34. Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana: banco de dados preparado por Rosely C. Oliveira. In: Ministério da Saúde. Base de dados online [citado mai 01 2006]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=962.
35. Oliveira ALL, Paniago AMM, Dorval MEC, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M, Cunha RV, Bóia MN. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. Rev. Soc. Bras.

Med. Trop. 2006;39(5):446-50.

36. Número de casos de Leishmaniose Visceral no período de 2001 a 2006. In: Secretaria de Estado de Saúde do Governo de Mato Grosso do Sul. Base de dados online [citado ago 02 2008]. Disponível em: http://www.saude.ms.gov.br/index.php?templat=list&voltar=home&id_comp=634.

37. Rey L. *Leishmania* e Leishmanioses: os parasitos. O complexo “*Leishmania braziliensis*” e a Leishmaniose Tegumentar Americana. O complexo “*Leishmania mexicana*” e as Leishmanioses Cutâneas das Américas. Leishmânias e Leishmanioses Cutâneas do Velho Mundo. O complexo “*Leishmania donovani*” e a Leishmaniose Visceral. In: Rey L. Parasitologia. 2 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p. 182-226.

38. Moraes MAP, Silveira FT. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Rev. Inst. Med. Trop. 1994;36(5):459-63.

39. Oliveira AG. Ecological studies on phlebotominae (diptera: psychodidae) in an urban area of the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil. 2006. Thesis. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. Base de dados online [citado ago 02 2008]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992007000100013&Ing.

40. Dorval MEMC. Epidemiological studies in a cutaneous Leishmaniasis in the municipality of Bela Vista, Mato Grosso do Sul State, Brazil. 2006. Thesis. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. Base de dados online [citado ago 02 2008]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992007000100012&Ing.

41. Osorio Y, Melby PC, Pirmez C, Chandrasekar B, Guarin N, Travi BL. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. Parasite Immunol. 2003;25:139-48.

42. Santos-Gomes GM, Campino L, Abranches P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2000;95(2): 193-8.

43. Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Leal CA, Marzochi MCA. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for Leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. Braz. J. Infect. Dis. 2004;8(6):440-4.

44. Jones DE, Elloso MM, Scott P. Host susceptibility factors to cutaneous Leishmaniasis. *Front. Biosci.* 1998;3:1171-80.
45. Alleva DG, Kaser SB, Beller DI. Intrinsic defects in macrophage IL-12 production associated with immune dysfunction in the MRL/++ and New Zealand black/white F₁ Lupus-prone mice and the *Leishmania major*-susceptible BALB/c strain. *The Journ. Immunol.* 1998; 161:6878-84.
46. Fechio CJ, Soares AMVC, Oliveira SL, Sartori A. Experimental visceral leishmaniasis in high and low antibody-producer mice (selection IV-A). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1999;32 (3):229-34.
47. Mohammadi MR, Zeinali M, Ardestani SK, Kariminia A. Identification of novel *Leishmania major* antigens that elicit IgG2a response in resistant and susceptible mice. *Korean J. Parasitol.* 2006;44(1):43-8.
48. Laurenti MD, Örn A, Sinhorini IL, Corbett CEP. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004;37(3):427-34.
49. Buxbaum LU, Scott P. Interleukin 10 and Fcγ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. *Infect. Immun.* 2005;73(4):2101-8.
50. Finger E. Bases gerais da resposta imune. Cooperação celular. Interleucinas. O sistema do complemento. In: Geller M, Scheinberg M. Diagnóstico e tratamento das doenças imunológicas: para clínicos, pediatras e residentes. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2005. p. 1-29.
51. Coutinho SG, Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA, Luca P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998;31(1):139-42.
52. Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Jesus AR, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal Leishmaniasis patients. *Infect. Immun.* 2002;70(12): 6734-40.
53. Abraham CM, Robles N, Palacios X, Vega C, Mairena AG, Santovenia JMB. Respuesta imune celular en enfermos con Leishmaniasis cutánea atípica. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 1999;15(1):25-9.
54. Etges R, Müller I. Progressive disease or protective immunity to *Leishmania major* infection: the result of a network of stimulatory and inhibitory interactions. *J. Mol. Med.*

1998;76(6):372-90.

55. Carvalho EM, Barral-Neto M, Barral A, Brokyn CI, Bacellar O. Immunoregulation in leishmaniasis. *Ciênc. Cult. (São Paulo)* 1994;46(5-6):441-5.

56. Brown DR, Reiner SL. Polarized helper-T-cell responses against *Leishmania major* in the absence of B cells. *Infect. Immun.* 1999;67(1):266-70.

57. Menon JN, Bretscher PA. Parasite dose determines the Th1/Th2 nature of the response to *Leishmania major* independently of infection route and strain of host or parasite. *Eur. J. Immunol.* 1998;28(12):4020-8.

58. Carvalho Filho EM. Imunidade celular na Leishmaniose visceral. [tese]. Salvador: Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia; 1985.

59. Badaró R, Carvalho EM, Jorge MGO, Teixeira RS, Rocha H. Imunidade humoral e celular em indivíduos curados de leishmaniose visceral. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1985;18(2):77-83.

60. Rhalem A, Sahibi H, Lasri S, Jaffe CL. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999;71(1):69-76.

61. Evans TG, Krug EC, Wilson ME, Vasconcelos AW, Alencar JE, Pearson RD. Evaluation of antibody responses in American visceral leishmaniasis by ELISA and immunoblot. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1989;84(2):157-66.

62. Montoya F, Restrepo M, Gomez ME. Inmunidad humoral y celular en la leishmaniasis cutánea. *Acta Méd. Colomb.* 1990;15(2):100-3.

63. Castés M, Tapia FJ. Inmunopatología de la leishmaniasis tegumentária Americana. *Acta Cient. Venez.* 1998;49(1):42-56.

64. Kropf P, Herath S, Klemenz R, Müller I. Signaling through the T1/ST2 molecule is not necessary for Th2 differentiation but is important for the regulation of type 1 responses in nonhealing *Leishmania major* infection. *Infect. Immun.* 2003;71(4):1961-71.

65. Convit J, Ulrich M. Antigen-specific immunodeficiency and its relation to the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Biol. Res.* 1993;26(1-2):159-66.

66. Souza WJS, Santos JR, Medeiros SM, Schubach AO, Cruz AM, Coutinho SG. Leishmanioses: reação de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos IgM em frações de soros separados por cromatografia de gel filtração. *J. Bras. Patol.* 1998;34(4):280-5.

67. Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, et al. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotas via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous Leishmaniasis. 2000;191(6):1063-7.
68. Liew FY, Xu D, Chan WL. Immune effector mechanism in parasitic infections. Immunol. Lett. 1999;65(1-2):101-4.
69. Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, Jesus AR, Filho DC, Filho AC, et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. J. Infect. Dis. 1999;180(5):1731-4.
70. Colmenares M, Constant SL, Kima PE, McMahon-Pratt D. *Leishmania pifanoi* pathogenesis: selective lack of a local cutaneous response in the absence of circulating antibody. 2002;70(12):6597-605.
71. Lima GM, Vallochi AL, Silva UR, Bevilacqua EM, Kiffer MM, Abrahamsohn IA. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. Immunol. Lett. 1998;64(2-3):145-51.
72. Barral-Netto M, Brodskyn C, Carvalho EM, Barral A. Cytokines in human leishmaniasis. Braz. J. Med. Biol. Res. 1998;31(1):149-55.
73. Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romão P, Silveira H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. Vet. Immunol. Immunopathol. 2002;88(1-2):21-30.
74. Caldas A, Favalli C, Aquino D, Vinhas V, Weyenbergh J, Brodskyn C, et al. Balance of IL-10 and interferon- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. BMC Infect. Dis. 2005;5:113.
75. Lima VMF, Peiro JR, Vasconcelos R. O. IL-6 and TNF- α production during active canine visceral leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. 2007;115:189-93.
76. Karplus TM, Jeronimo SMB, Chang H, Helms BK, Burns TL, Murray JC, et al. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. Infect. Immun. 2002;70(12):6919-25.
77. Rodrigues V, Silva JS, Campos-Neto A. Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. Infect. Immun. 1998;66(3):1233-6.
78. Pinheiro RO, Pinto EF, Lopes JRC, Guedes HLM, Fentanes RF, Rossi-Bergmann B. TGF- β associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular

vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. Microb. Infec. 2005;7(13):1317-23.

79. Murray HW, Flanders KC, Donaldson DD, Sypek JP, Gotwals PJ, Liu J, et al. Antagonizing deactivating cytokines to enhance host defense and chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. Infect. Immun. 2005;73(7):3903-11.

80. Saha B, Saini A, Germond R, Perrin PJ, Harlan DM, Davis TA. Susceptibility or resistance to *Leishmania* infection is dictated by the macrophages evolved under the influence of IL-3 or GM-CSF. Eur. J. Immunol. 1999;29(7):2319-29.

81. Uzonna JE, Bretscher PA. Anti-IL-4 antibody therapy causes regression of chronic lesions caused by medium-dose *Leishmania major* infection in BALB/c mice. Eur. J. Immunol. 2001;31(11):3175-84.

82. Heinzel FP, Rerko RM. Cure of progressive murine Leishmaniasis: interleukin 4 dominance is abolished by transient CD4⁺ T cell depletion and T helper cell type 1-selective cytokine therapy. J. Exper. Med. 1999;189(12):1895-905.

83. Noben-Trauth N. Susceptibility to *Leishmania major* infection in the absence of IL-4. Immunol. Lett. 2000;75(1):41-4.

84. Alexander J, Brombacher F, McGachy HA, McKenzie AN, Walker W, Carter KC. An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following *Leishmania mexicana* infection. Eur. J. Immunol. 2002;32(10):2923-33.

85. Alexander J, Carter KC, Al-Fasi N, Satoskar A, Brombacher F. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. Eur. J. Immunol. 2000;30(10):2935-43.

86. Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrel JP. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. Eur. J. Immunol. 2001;31(10):2848-56.

87. Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. J. Infect. Dis. 2001;183(9):1421-4.

88. Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. J. Exp. Med. 2001;194(10):1497-506.

89. Murray HW, Moreira AL, Lu CM, DeVecchio JL, Matsuhashi M, Ma X, et al. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental

visceral leishmaniasis. J. Infec. Dis. 2003;188:458-64.

90. Hondowicz BD, Park AY, Elloso MM, Scott P. Maintenance of IL-12-responsive CD4⁺ T cells during a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. Eur. J. Immunol. 2000;30(7):2007-14.

91. Heinzl FP, Rerko RM, Hujer AM. Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity. Cell. Immunol. 1998;184(2):129-42.

92. Schopf LR, Bliss JL, Lavigne LM, Chung CL, Wolf SF, Sypek JP. Interleukin-12 is capable of generating an antigen-specific Th1-type response in the presence of an ongoing infection-driven Th2-type response. Infect. Immun. 1999;67(5):2166-71.

93. Constantinescu CS, Hondowicz BD, Elloso MM, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. The role of IL-12 in the maintenance of an established Th1 immune response in experimental leishmaniasis. Eur. J. Immunol. 1998;28(7):2227-33.

94. Ohkusu K, Yoshimoto T, Takeda K, Ogura T, Kashiwamura S, Iwakura Y, et al. Potentiality of interleukin-18 as a useful reagent for treatment and prevention of *Leishmania major* infection. Infect. Immun. 2000;68(5):2449-56.

95. Kocyigit A, Gur S, Gurel MS, Bulut V, Ulukanligil M. Antimonial therapy induces circulating proinflammatory cytokines in patients with cutaneous leishmaniasis. Infect. Immun. 2002;70(12):6589-91.

96. Awasthi A, Mathur R, Khan A, Joshi BN, Jain N, Sawant S, et al. CD40 signaling is impaired in *L. major*-infected macrophages and is rescue by a p38 MAPK activator establishing a host-protective memory T cell response. J. Exp. Med. 2003;197(8):1037-43.

97. Nunes MP, Cysne-Finkelstein L, Monteiro BC, Souza DM, Gomes NA, Reis GA. CD40 signaling induces reciprocal outcomes in *Leishmania*-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. Micr. Infect. 2005;7(1):78-85.

98. Murray HW, Lu CM, Brooks EB, Fichtl RE, DeVecchio JL, Heinzl FP. Modulation of T-cell costimulation as immunotherapy or immunochemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. Infect. Immun. 2003;71(11):6453-62.

99. Padigel UM, Farrell JP. CD40-CD40 ligand costimulation is not required for initiation and maintenance of a Th1-type response to *Leishmania major* infection. Infect. Immun. 2003;71(3):1389-95.

100. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. Nat. Rev. Immunol. 2002;2:

116-26.

101. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 2005;23:515-48.
102. Favali C, Costa D, Afonso L, Conceição V, Rosato A, Oliveira F, et al. Role of costimulatory molecules in immune response of patients with cutaneous leishmaniasis. *Micr. Infect.* 2005;7(1):86-92.
103. Heinzel FP, Maier RA. Interleukin-4-independent acceleration of cutaneous leishmaniasis in susceptible BALB/c mice following treatment with anti-CTLA4 antibody. *Infect. Immun.* 1999;67(12):6454-60.
104. Saha B, Chattopadhyay S, Germond R, Harlan DM, Perrin PJ. CTLA4 (CD152) modulates the Th subset response and alters the course of experimental *Leishmania major* infection. *Eur. J. Immunol.* 1998;28(12):4213-20.
105. Zaph C, Scott P. Th1 cell-mediated resistance to cutaneous infection with *Leishmania major* is independent of P- and E-selectins. *J. Immunol.* 2003;171:4726-32.
106. Rodriguez-Sosa M, Rosas LE, Terrazas LI, Lu B, Gerard C, Satoskar AR. CC chemokine receptor 1 enhances susceptibility to *Leishmania major* during early phase of infection. *Immunol. Cell. Biol.* 2003;81:114-20.
107. Conrad SM, Strauss-Ayali D, Field AE, Mack M, Mosser DM. *Leishmania*-derived murine monocyte chemoattractant protein 1 enhances the recruitment of a restrictive population of CC chemokine receptor 2-positive macrophages. *Infect. Immun.* 2007;75(2):653-65.
108. Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Cuentas AL, Costa JML, Cuba CAC, et al. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*: resposta humoral tissular. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1986;28(5):293-9.
109. Souza MA, Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto S Jr, Ferreira MS. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2005;38(2):137-41.
110. Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003;91(3-4):161-8.
111. Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and

- experimental canine leishmaniosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 2001;79(3-4):273-84.
112. Pedras MJ, 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. 2003;47(3):477-85.
 113. Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. 1999;67(2):117-30.
 114. Atta AM, Colossi R, Souza-Atta MLB, Jeronimo SMB, Nascimento MDSB, Bezerra GF, et al. Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2004;99(5): 525-30.
 115. Souza-Atta MLB, Araújo MI, D'oliveira A Jr, Jesus AR, Almeida RP, Atta AM, et al. Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases. Braz. J. Med. Biol. Res. 1999;32(9): 1101-5.
 116. Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SMB, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. J. Exper. Med. 2005; 201(5):747-54.
 117. Mariano ON, Cunha RH, Silva AA, Chavez J, Vaz CA. Complexos imunes no calazar experimental. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 1982;24(3):125-31.
 118. Pappas MG, Hajkowski R, Hockmeyer WT. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral Leishmaniasis. J. Immunol. Methods 1983;64(1-2):205-14.
 119. Ferreira MP, Roselino AMF, Nascimento MMP, Aires JM, Figueiredo JFC. Sensitivity of an immunoenzymatic test for the detection of anti-*L. braziliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 2006;48(4):215-7.
 120. Sotto MN. Leishmaniose tegumentar americana: imunopatologia diagnóstica e contribuição à patogenia [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1986.
 121. Silva RM. Estudo comparativo entre os métodos ELISA e imunofluorescência indireta na análise de amostras de sangue de cães provenientes de municípios endêmicos e enzoóticos

para leishmaniose visceral americana [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2005.

122. Rosário EY, Genaro O, França-Silva JC, Costa RT, Mayrink W, Reis AB, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2005;100(2):197-203.

123. Baleeiro CO, Paranhos-Silva M, Santos JC, Oliveira GGS, Nascimento EG, Carvalho LP, et al. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniasis endemic area. Vet. Parasitol. 2006;139(1-3):21-8.

124. Canto-Lara SB, Wynsberghe NRV, Vargas-González A, Ojeda-Farfán FF, Andrade-Narváez FJ. Use of monoclonal antibodies for the identification of *Leishmania spp.* isolated from humans and wild rodents in the state of campeche, Mexico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1999;94(3):305-9.

125. Jaffe CL, McMahon-Pratt D. Serodiagnostic assay for Visceral Leishmaniasis employing monoclonal antibodies. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1987;81(4):587-94.

126. Rocha RDR, Gontijo CMF, Elói-Santos SM, Carvalho AT, Correa-Oliveira R, Marques MJ, et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2002;35(6):551-62.

127. Kohanteb J, Ardehali S. Cross-reaction of sera from patients with various infections diseases with *Leishmania infantum*. Med. Princ. Pract. 2005;14(2):79-82.

128. Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C. Specific serodiagnosis of human Leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1996;3(4):387-91.

129. Goto Y, Coler RN, Reed SG. Bioinformatic identification of tandem repeat antigens of the *Leishmania donovani* complex. Infect. Immun. 2007;75(2):846-51.

130. Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Brazil RP. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. Gen. Molec. Res. 2004;3(2):251-7.

131. Amato VS, Duarte MIS, Nicodemo AC, Carvalho LV, Pagliari C, Matta VLR, et al. An evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. Rev. Inst. Med. Trop.

São Paulo 1998;40(1):4665.

132. Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of american tegumentary leishmaniasis patients. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2001;96(7):987-96.

133. Dellavance A, Gabriel A Jr, Cintra AFU, et al. II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em células Hep-2. Rev. Bras. Reumatol. 2003;43(3):129-40.

134. Aarden A, De Groot ER, Feltkamp TEW. Immunology of DNA. III. *Crithidia luciliae*, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1975;254:505-15.

135. McClain MT, Ramsland PA, Kaufman KM, James JA. Anti-Sm autoantibodies in systemic lupus target highly basic surface structures of complexed spliceosomal autoantigens. J. Immunol. 2002;168:2054-62.

136. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. Ann. Rheum. Dis. 1987;46:1-6.

137. Shott, S. Statistics for health professionals. London: W. B. Saunders Company; 1990.

138. Fernandes LC. Leishmaniose cutâneo-mucosa em Nioaque – MS. Aspectos clínicos e epidemiológicos. F med (BR) 1990;101(2):93-5.

139. Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Noguchi RC, Arão LB, Hans Filho G et al. Estudo epidemiológico sobre leishmaniose tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul – Estudos na população humana. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1995;28(3): 185-93.

140. Silveira TGV, Teodoro U, Lanardoni MVC, Guilherme ALF, Toledo MJO, Ramos M, et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do estado do Paraná, Brasil. Cad. Sal. Publ. 1996;12(2):141-7.

141. Silveira TGV, Arraes SMAA, Bertolini DA, Teodoro U, Lonardoni MVC, Roberto ACBS, et al. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1999;32(4): 413-23.

142. Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral ALLV, Fiúza VOP, Rabello A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2001;34(3):85-92.

143. Dorval MEMC, Oshiro ET, Cupollilo E, Castro ACC, Alves TP. Ocorrência de

leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006;39(1):43-6.

144. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. New Engl. J. Med. 2003;349(16):1526-33.

145. Griemberg G, Ferrarotti NF, Avibel G, Ravelli MR, Taranto NJ, Malchiodi EL, et al. Inmunofluorescencia con *Crithidia luciliae* para la deteccion de anticuerpos anti-AND. Medicina (Buenos Aires) 2006;66:3-8.

146. Freitas MVC, Silva LM, Petean FC, Carvalho IF, Franco RF, Donadi EA, et al. Síndrome do anticorpo antifosfolípide: estudo comparativo das formas primária e secundária. Rev. Bras. Reumatol. 2003;43(3):153-9.

147. Repka JCD, Skare TL, Salles G Jr, Paul GM. Anticorpo anticardiolipina em pacientes com mal de Hansen. Rev. Bras. Reumatol. 2001;41(1):1-6.

148. Terrazzano G, Cortese L, Piantedosi D, Zappacosta S, Di Loria A, Santoro D, et al. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Vet. Immunol. Immunopathol. 2006;110(3-4):331-7.

149. Atta AM, Carvalho EM, Jeronimo SMB, Sousa-Atta MLB. Serum markers of rheumatoid arthritis in visceral leishmaniasis: rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody. J Autoimmun. 2007;28:55-8.

150. Utiyama SRR, Reason ITM, Kotze LMS. O Sistema Complemento nas Doenças: Genética e Patogenia. Rev. Bras. Reumatol. 2004;44(4):277-86.

151. Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. Europ. J. Dermatol. 2007;17(2):115-22.

152. Ribeiro Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. Braz. J. Med. Biol. Res. 1998;31(1):143-8.

10. APÊNDICES

APÊNDICE 01

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

APÊNDICE 1.1

CARTA DE INFORMAÇÃO

Meu nome é Alex Magno Coelho Horimoto e estou fazendo uma pesquisa para minha Tese de Mestrado.

Convido o (a) senhor (a) para participar desta pesquisa que tem o título de: “FREQUÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS E DOSAGEM DE COMPLEMENTO SÉRICO EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA OU VISCERAL”.

Os participantes serão pacientes de 12 a 80 anos, com diagnóstico de Leishmaniose Visceral ou Tegumentar que fazem acompanhamento e tratamento da doença no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, de março de 2007 a março de 2008.

Estou pesquisando para conhecer sobre as manifestações clínicas e laboratoriais da Leishmaniose Visceral e Tegumentar, contribuindo para o diagnóstico precoce e melhoria da qualidade do serviço e do atendimento aos pacientes.

Sua participação consiste em comparecer ao hospital para consulta clínica, em data e horário que serão marcados, permitir avaliação clínica com coleta de material para exames de sangue e responder às perguntas do pesquisador para preenchimento de questionário.

Informo ainda que:

- O (a) senhor (a) tem direito de não participar desta pesquisa, se assim o desejar, sem prejuízo do seu tratamento.
- Os benefícios a serem esperados serão de melhor reconhecimento da sua doença e tratamento mais precoce em outros pacientes.
- Caso aceite participar, garanto o anonimato e segredo quanto ao seu nome e informações prestadas durante a entrevista. Não divulgarei seu nome nem qualquer informação que possa identificá-lo ou que estejam relacionadas à sua intimidade.
- Garanto que não haverá qualquer prejuízo ou alteração do seu tratamento por causa das informações que serão fornecidas pelo senhor (a).
- Garanto o esclarecimento antes e durante qualquer momento no decorrer da pesquisa se o senhor (a) julgar necessário. Para tal fim deixo o telefone (67) 3345-3203 para esclarecimentos e quaisquer dúvidas.
- Todos os materiais e técnicas utilizados para a coleta de exames são seguros e esterilizados, não representando risco à sua saúde. Os riscos e desconfortos se relacionam com a coleta de sangue, sendo que poderá ocorrer ou não dor durante a coleta e formação de hematoma no local da punção. Não são esperados outros riscos com a sua participação.
- Mesmo tendo aceitado participar, se por qualquer motivo resolver desistir, mesmo durante o andamento da pesquisa, tem toda a liberdade para retirar seu consentimento.
- Este Termo de Consentimento será feito em duas vias, sendo que uma delas ficará em poder do senhor (a), e a outra cópia será arquivada por período de 5 anos.

Espero poder contar com sua colaboração, a qual desde já agradeço.

APÊNDICE 1.2

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu _____ concordo em participar do estudo sobre “FREQUÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS E DOSAGEM DE COMPLEMENTO SÉRICO EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA OU VISCERAL”. Autorizo a utilização dos dados coletados para a realização do estudo. Tenho conhecimento do seu caráter científico, dos objetivos, método de coleta de dados (entrevista, exame clínico e laboratorial, preenchimento de questionário) e condições de segurança, sendo minha participação estritamente voluntária. Estou ciente de que as informações serão tratadas de forma anônima e sigilosa e de que não sofrerei nenhum tipo de sanção ou prejuízo, caso me recuse a participar.

Assinatura

Campo Grande, ____/____/____.

Testemunhas:

APÊNDICE 2

FICHA DE AVALIAÇÃO

FREQUÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS E DOSAGEM DE COMPLEMENTO SÉRICO
EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA OU
VISCERAL

Código do paciente:

Data de nascimento:

Idade:

Sexo: ☐ feminino

☐ masculino

Naturalidade:

Procedência:

Diagnóstico de Leishmaniose: ☐ VISCERAL ☐ TEGUMENTAR ☐

Método: Sorologia ☐

Cultura ☐

Biópsia cutânea ☐

Exames laboratoriais:

FAN: título: _____ padrão: _____

VHS inicial: _____

PCR inicial: _____

AGPA inicial: _____

C4: _____

C3: _____

☐ DNA ☐ Sm ☐ RNP ☐ Ro (SSA) ☐ La (SSB)

☐ anti cardiolipina ☐ IgM _____ ☐ IgG _____

☐ Fator Reumatóide ☐ VDRL ☐ outros _____

11. ANEXOS

ANEXO A

CERTIFICADO DE COMISSÃO DE ÉTICA

ANEXO B**CERTIFICADO DE TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO**

