

Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana

Anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote antibodies, detected by flow cytometry, to identify active infection in american cutaneous leishmaniasis

Roberta Dias Rodrigues Rocha¹, Célia Maria Ferreira Gontijo¹, Silvana Maria Elói-Santos^{1,2},
Andréa Teixeira Carvalho^{1,3}, Rodrigo Corrêa-Oliveira¹, Marcos José Marques⁴,
Odair Genaro⁴, Wilson Mayrink⁴ e Olindo Assis Martins-Filho^{1*}

Resumo Neste estudo, descrevemos etapas iniciais de padronização de uma nova metodologia para detecção de anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, pela citometria de fluxo e a análise de sua aplicabilidade para estudos clínicos. Foram avaliados 39 indivíduos com sorologia convencional (RIFI) positiva para leishmaniose, classificados quanto à ausência/presença de lesão (L- e L+). Os resultados foram expressos sob a forma de percentual de parasitas fluorescentes positivos (PPFP). A análise dos dados, na diluição 1:1.024, permitiu distinguir 95% dos pacientes L+ como um grupo de alta reatividade (PPFP>50%) e 72% dos indivíduos L- como um grupo de baixa reatividade (PPFP≤50%). A análise dos títulos da reação de imunofluorescência indireta não demonstrou nenhuma relação com a ausência/presença de lesão. Em conjunto, nossos dados sugerem a aplicabilidade da citometria de fluxo na identificação dos casos de infecção ativa, o que não tem sido possível através das reações sorológicas convencionais.

Palavras-chaves: Leishmaniose tegumentar americana. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Anticorpos antipromastigotas vivas. Citometria de fluxo.

Abstract In the current study we described initial standardization steps of a new methodology to detect anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote antibodies by flow cytometry, followed by analysis of its applicability to clinical studies. We have studied 39 individuals with positive conventional serology to leishmaniasis, classified according to the absence/presence of cutaneous lesions (L- and L+). The results were expressed as percentage of positive fluorescent parasites (PPFP). Data analysis at dilution of 1:1,024, allowed the distinction of 95% of L+ patients as a group of high reactivity (PPFP>50%) and 72% of L- individuals as a group of low reactivity (PPFP≤50%). The analysis of immunofluorescence assay titers did not show any relationship with the absence/presence of lesion. Together, our data support the applicability of flow cytometry to identify cases of active infection, which has not been possible through conventional serological reactions.

Key-words: American cutaneous leishmaniasis. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Anti-live promastigote antibodies. Flow cytometry.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose causada por protozoários parasitas intracelulares do gênero *Leishmania*, com uma ampla distribuição geográfica em áreas tropicais e subtropicais das Américas³¹. Constitui uma enfermidade polimórfica da pele e das mucosas, caracterizada pela existência de uma variedade de formas clínicas, variando de lesões auto-resolutivas a lesões desfigurantes. A doença

apresenta uma prevalência de 12 milhões de casos, sendo que cerca de 350 milhões de pessoas encontram-se em risco de adquirir a infecção⁴¹. No Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a LTA constitui um problema de saúde pública. Dados epidemiológicos demonstram que, no Brasil, a LTA representa a segunda doença tropical de maior prevalência, sendo as regiões norte e nordeste as principais áreas endêmicas¹³

1. Laboratório de Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG. 2. Departamento de Propedêutica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 3. Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, Belo Horizonte, MG. 4. Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. *In memoriam. Apoio Financeiro: Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG.

Endereço para correspondência: Dr. Olindo Assis Martins-Filho. Av. Augusto de Lima 1715, Barro Preto, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil.
e-mail: oamfilho@cpqrr.fiocruz.br

Recebido para publicação em 5/3/2002.

Em indivíduos portadores de LTA, o sistema imunológico é capaz de montar uma resposta celular e humoral induzida por antígenos derivados do parasita⁹. Devido à importância da LTA em saúde pública, muitos estudos estão sendo realizados com o objetivo de caracterizar melhor os mecanismos imunológicos associados à infecção. Vários trabalhos sugerem que a resposta imune celular do tipo 1, caracterizada pela produção de IFN-gamma, tenha um papel protetor na LTA^{1 3 4 28}. Entretanto, a contribuição da resposta imune humoral neste contexto é ainda controversa e o envolvimento de anticorpos na proteção bem como em mecanismos imunopatológicos da doença não estão ainda bem estabelecidos^{30 33}. Os métodos que avaliam a resposta imune humoral são baseados, até o momento, exclusivamente na pesquisa sorológica *in vitro*, utilizando antígenos solúveis ou preparações antigênicas de parasitas fixados, tais como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a hemoaglutinação indireta (HAI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). A análise de anticorpos através dos métodos de sorologia convencional, além de apresentar reatividade cruzada com outras espécies da família *Trypanosomatidae*^{6 24}

chama a atenção para os baixos níveis de anticorpos^{2 8 27 38 39} e uma ausência de relação desses níveis com a presença de infecção ativa^{7 39}. Recentemente, desenvolvemos em nosso laboratório uma metodologia para identificação de anticorpos antiformas tripomastigotas vivas do *Trypanosoma cruzi*²⁵, que avalia no contexto *ex vivo* a reatividade de anticorpos dirigidos contra antígenos de membrana do parasita, evitando, dessa forma, a reatividade dos soros com estruturas intracitoplasmáticas, alvos da reatividade cruzada com outros tripanosomatídeos. De maneira análoga, padronizamos esta metodologia para detecção de anticorpos anti formas vivas de *Leishmania (V.) braziliensis*. Este estudo visa avaliar a existência de uma correlação entre a resposta imune humoral e a presença de infecção ativa.

Neste estudo apresentamos dados referentes à padronização desta metodologia e sua habilidade em identificar, na diluição 1:1.024, uma reatividade diferencial em casos de infecção em atividade clínica (L+). Nossos resultados sugerem a aplicabilidade da citometria de fluxo na diferenciação de casos de infecção ativa, o que não tem sido possível através do uso de métodos sorológicos convencionais.

MATERIAL E MÉTODOS

População avaliada. A Tabela 1 resume as informações referentes aos grupos de indivíduos avaliados. Os indivíduos incluídos nesse estudo foram selecionados a partir de um inquérito clínico-laboratorial

(sorológico e parasitológico) realizado em áreas endêmicas para leishmaniose, nos Municípios de Araçuaí e Caratinga, MG, Brasil, no período de 1996 a 2000.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de indivíduos avaliados, segundo idade e sexo.

Grupos	Nº	Idade (anos)			Sexo	
		faixa	média ± dpm	mediana	M	F
Etapas de padronização						
PN	10	24-50	38,9±9,1	41	7	3
PNE	10	4-62	29,2±21,4	29	5	5
PL	7	2-57	35,2±22,1	33	4	3
Análise do método						
NE	10	4-62	29,2±21,4	29	5	5
L-	18	7-72	42,0±18,9	45	5	13
L+	21	9-69	29,5±17,5	23	16	5

M= masculino; F= feminino; PN= mistura de soros normais de área não endêmica; PNE= mistura de soros normais de área endêmica; PL= mistura de soros de pacientes portadores de LTA; NG= indivíduos normais de área endêmica; L- = indivíduos RIFI+ com ausência de lesão; L+ = pacientes RIFI+ com presença de lesão.

Para as etapas iniciais de padronização da metodologia de pesquisa de anticorpos antiformas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* foram utilizadas misturas de soros de indivíduos residentes em Araçuaí, MG, apresentando sorologia convencional (RIFI) positiva para leishmaniose, intradermoreação de Montenegro positiva e presença de lesão ativa (PL=7). O controle negativo de área não endêmica foi constituído por uma mistura de soros de voluntários saudáveis, residentes em Belo Horizonte, MG, apresentando sorologia convencional negativa para leishmaniose (PN=10). O grupo controle negativo de área endêmica foi constituído

por uma mistura de soros de indivíduos saudáveis, residentes em Araçuaí, MG, apresentando sorologia convencional negativa para leishmaniose (PNE=10).

Para os ensaios de análise do método, foram utilizadas amostras individuais de soros de indivíduos residentes em Araçuaí e Caratinga, MG, com sorologia convencional positiva para leishmaniose (n=39), classificados em dois subgrupos em função da ausência ou presença de lesão (L- =18; L+ =21). Todos os indivíduos do grupo L+ apresentavam diagnóstico parasitológico positivo. O grupo controle negativo de área endêmica foi constituído por amostras individuais

de indivíduos saudáveis, residentes em Araçuaí, MG, apresentando sorologia convencional negativa para leishmaniose (NE=10).

Coleta e processamento das amostras. As amostras de soros foram inativadas a 56°C por 30 minutos e centrifugadas a 1.000g a 4°C por 5 minutos para remoção de partículas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi alíquotado e estocado a -20°C até sua utilização. No momento do uso, as amostras foram descongeladas, diluídas em solução salina tamponada com fosfato-PBS (0,15M, 8g/l de NaCl, 2g/l de KCl, 2g/l de KH₂PO₄ e 1,15g/l de Na₂HPO₄, pH 7,2, Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma Chemical Corp, St. Louis, MO), centrifugadas a 4°C, 1.000g por 5 minutos e os sobrenadantes utilizados para os ensaios de citometria de fluxo. Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, 0070/99-CPE/FIOCRUZ.

Cultivo das formas promastigotas. As formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/2903) foram cultivadas em erlenmeyers contendo meio ágar-sangue, Novy-MacNeal-Nicolle associado ao meio líquido complexo liver infusion tryptose - LIT, conhecido como meio NNN-LIT. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D (modelo 347) a temperatura de 24 ± 1°C, durante o período de quatro dias. A cada quatro dias as culturas foram examinadas quanto a motilidade, morfologia e ausência de contaminação e os parasitas foram re-inoculados pela transferência de 1x10⁶ promastigotas/ml para um novo erlenmeyer contendo NNN-LIT. Este procedimento foi repetido a cada quatro dias para manutenção de culturas em fase log. As culturas de quatro dias de cultivo em meio NNN-LIT foram também utilizadas para o inóculo de parasitas (1x10⁶ promastigotas/ml) para um erlenmeyer contendo apenas a fase líquida – LIT. No meio contendo apenas LIT, os parasitas foram incubados por um período de 4, 7 e 10 dias de cultivo para serem utilizados nos experimentos de padronização da metodologia.

Preparo das formas promastigotas para os ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo. Os parasitas, em diferentes dias de cultivo em LIT (4, 7 e 10 dias) foram transferidos para tubos de polipropileno de 50ml (Falcon), homogeneizados em vórtex a baixa rotação (rotação 4) para desfazer os grumos. Em seguida, a suspensão foi submetida a uma centrifugação diferencial (25°C, 200g por 10 minutos) para remoção de contaminantes como eritrócitos e grumos de parasitas no sedimento. Para recuperação dos parasitas no sobrenadante, estes foram deixados em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno de 50ml e o sedimento foi desprezado. Em seguida os parasitas foram lavados em PBS contendo 10% de SFB, por duas vezes, por centrifugação a 4°C, 1.000g por 10 minutos. O sedimento formado foi homogeneizado cuidadosamente. Ao final das etapas de

lavagem, procedia-se a contagem do número de parasitas e a suspensão celular ajustada para aproximadamente 5x10⁶ ou 10x10⁶ promastigotas/ml.

Estudo dos anticorpos IgG por citometria de fluxo. Os ensaios de citometria de fluxo para o estudo de anticorpos antiformas vivas de *L. (V.) braziliensis* presentes em soro de pacientes portadores de LTA foram realizados segundo protocolo descrito por Martins-Filho et al²⁵ para pesquisa de anticorpos anti tripomastigotas vivas do *Trypanosoma cruzi*, adaptado para microplacas, conforme descrito a seguir: alíquotas de 50µl do soro diluído em PBS-10% SFB (1:64 a 1:131.072) foram adicionadas em placas de 96 poços, fundo em "U" (LINBRO, ICN Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio) juntamente com 50µl da suspensão de parasitas (2,5 x 10⁵ ou 5 x 10⁵ parasitas/poço). A mistura foi incubada a 25°C por 30 minutos ou a 37°C por 30 minutos, lavada duas vezes com 150µl de PBS-10% SFB por centrifugação (4°C, 1.000g por 10 minutos) e o sobrenadante desprezado.

Para revelação da ligação de IgG na superfície do parasita, procedeu-se à incubação das formas promastigotas, na presença de 50µl de anticorpo policlonal anti-IgG humano (específico para a porção Fc) marcado com isotiocianato de fluoresceína-FITC (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) nas diluições 1:200, 1:400 e 1:800 em PBS-10% SFB. As temperaturas e tempos de incubação foram variáveis, sendo 30 minutos a 25°C para os parasitas incubados com o soro humano a 25°C por 30 minutos; 37°C por 30 minutos e 4°C por 60 minutos para os parasitas incubados com o soro humano a 37°C por 30 minutos, sempre ao abrigo da luz. Os parasitas foram novamente lavados duas vezes com 150µl de PBS-10% SFB por centrifugação (4°C, 1.000g, 10 minutos) e o sobrenadante desprezado. Os parasitas foram então fixados com 200µl de solução fixadora para citometria (10g/l de paraformaldeído, 10,2g/l de cacodilato de sódio e 6,65g/l de cloreto de sódio, pH 7,2, Sigma Chemical Corp, St. Louis, MO) e incubados por pelo menos 30 minutos a 4°C. As amostras foram mantidas a 4°C, ao abrigo de luz, até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACScan-Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA).

Para cada ensaio foi feito um controle interno da reação, para avaliar a ligação inespecífica do anticorpo secundário. Neste controle, os parasitas foram incubados na ausência de soro humano, porém na presença do anticorpo secundário anti-IgG humano fluoresceinado. Em todos as baterias de testes foram incluídas amostras de soros controles positivo e negativo para LTA.

Aquisição e análise dos dados da citometria de fluxo. A aquisição e análise dos dados foram realizadas no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson) empregando o software Cell-Quest. Para cada amostra individual foram adquiridas informações relativas aos parâmetros tamanho, granulosidade e intensidade

relativa de fluorescência de 10.000 parasitas. A Figura 1A mostra a distribuição característica e homogênea que as formas promastigotas apresentam em gráficos de tamanho versus granulidade, o que permite o posicionamento de um marcador sobre a região correspondente à população de interesse (R1). Esse perfil foi obtido ajustando-se os ganhos de tamanho e granulidade, em escala log, com valores E00 e 300, respectivamente. Utilizando histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de parasitas, procedia-se a análise da intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada. Para cada experimento foi estabelecido um limiar de positividade de no máximo 2%, em função da curva de fluorescência do tubo controle de ligação inespecífica do anticorpo secundário (Figura 1B). Em seguida, empregando-se o mesmo marcador foram obtidos os

valores do percentual de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) para cada amostra individual (Figura 1C e D). A análise dos resultados foi realizada segundo descrito por Martins-Filho et al²⁵ estabelecendo um valor de PPFP de 20% como um ponto de corte entre resultados positivos e negativos. Nas etapas de padronização da metodologia, onde foram empregadas misturas de soros, os valores de PPFP foram classificados em positivo ou negativo para cada diluição da mistura. Na análise do método, onde foram avaliados os soros individuais, os valores de PPFP foram classificados em positivo ou negativo considerando a média dos valores obtidos para cada grupo de soros testados. Num estudo posterior, foi estabelecido um valor de PPFP de 50% como limiar entre baixa e alta reatividade, segundo descrito por Cordeiro et al¹⁰.

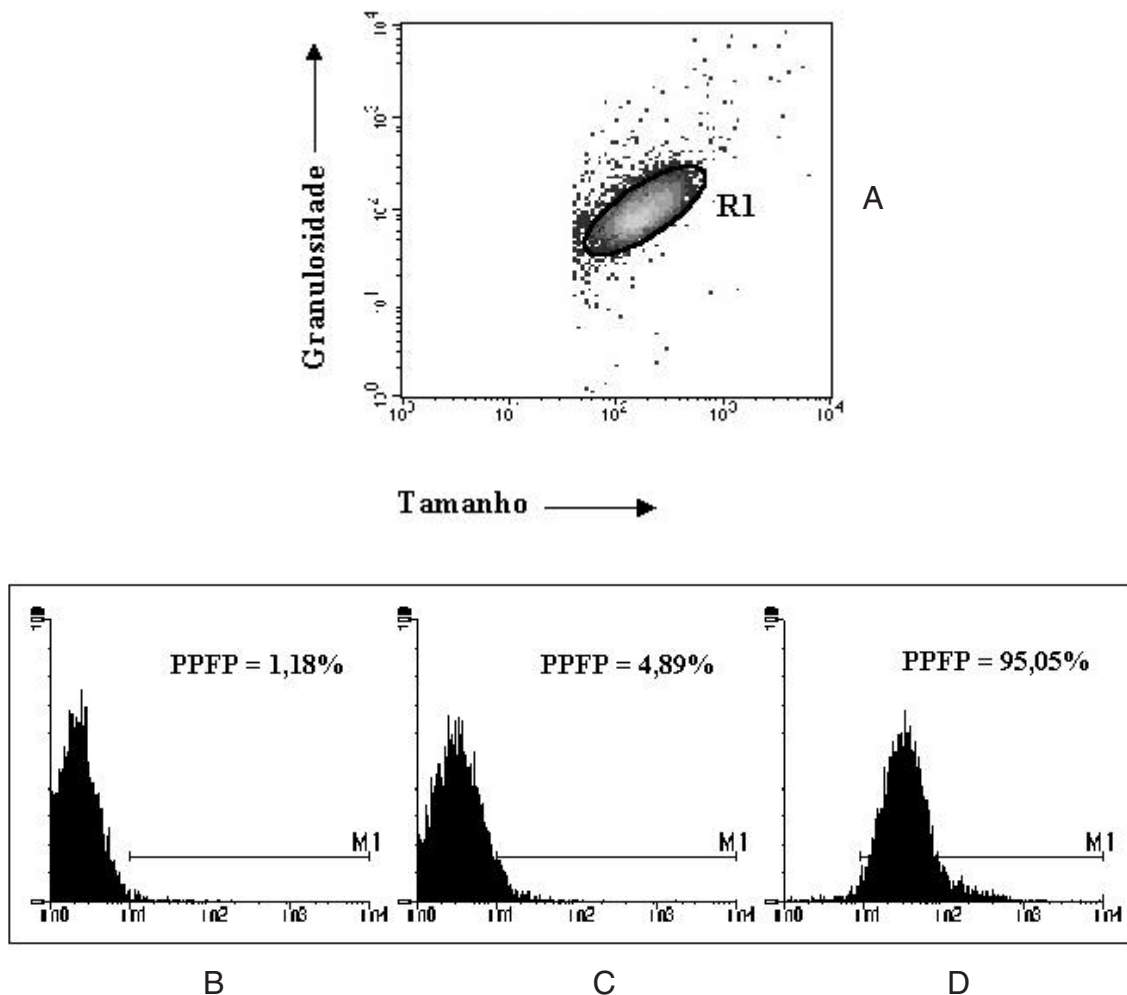


Figura 1 - Seqüência de análise de anticorpos anti promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* por citometria de fluxo. Seleção da população de formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, em gráficos de tamanho e granulidade (A). Histogramas individuais representando o percentual de parasitas fluorescentes (PPFP) obtidos com controle interno da reação (B), após a incubação com um soro não infectado (C) e com soro de um paciente portador de leishmaniose (D). O posicionamento do marcador (M1) segue o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle interno da reação, segundo descrito em material e métodos.

Análise estatística. A análise estatística foi realizada utilizando o software Minitab 9.2. O estudo estatístico comparativo entre grupos foi realizado empregando a Análise de Variância - ANOVA

ONEWAY. Diferenças estatisticamente significativas foram identificadas pelo teste t de Student. A diferença entre grupos foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Etapas iniciais de padronização. *Influência da fase de cultivo de promastigotas na pesquisa de anticorpos anti formas promastigotas vivas:* a Figura 2 mostra os resultados da reatividade de IgG total anti formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*, expressos como PFP, em mistura de soros de indivíduos não infectados (PN), de indivíduos não infectados de área endêmica para leishmaniose (PNE) e de pacientes portadores de leishmaniose (PL). A análise dos resultados mostrou que os ensaios realizados com promastigotas de 4 dias de cultivo apresentaram um

perfil de reatividade que permitiam identificar a mistura de soros PL como positiva (PFP > 20%) e as misturas PN e PNE como negativas (PFP ≤ 20%), nas diluições do soro humano 1:1.024 a 1:4.096. O uso de promastigotas de 7 dias de cultivo promoveu um aumento nos valores de PFP para a mistura PN e PNE, embora apenas na mistura PN os resultados de PFP foram superiores a 20%, nas diluições do soro humano 1:1.024 e 1:2.048. A utilização de promastigotas de 10 dias de cultivo promoveu uma elevação menos intensa nos valores de PFP apenas da mistura PN.

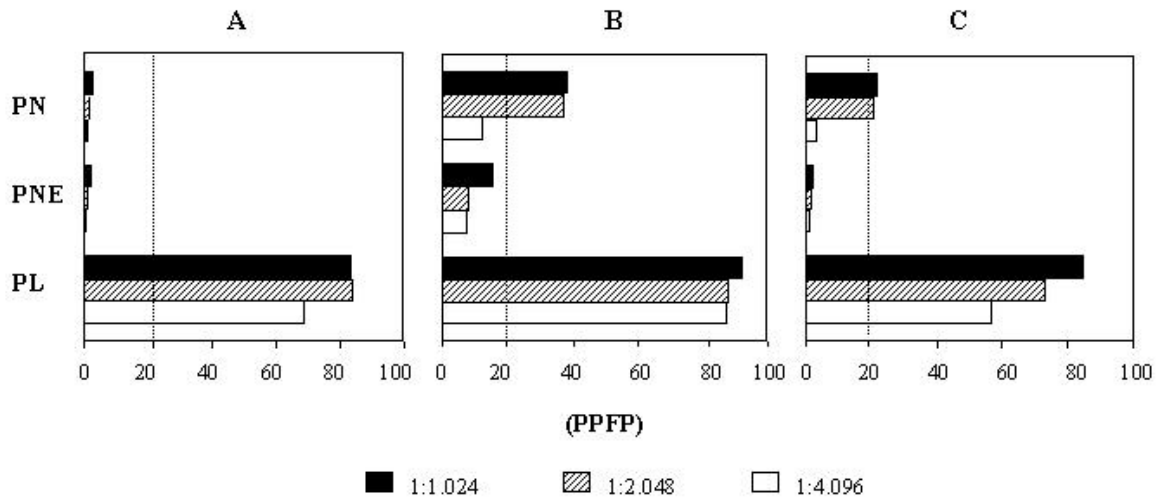


Figura 2 - Influência da fase de cultivo do parasita (A= 4 dias, B= 7 dias e C= 10 dias) nos valores de PFP, após incubação de promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* com soro humano a 37°C/30 minutos em diferentes diluições, seguida por incubação com anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com FITC (1:400) a 4°C/60 minutos. Os resultados estão expressos como valores individuais de PFP para cada diluição da mistura de soros, segundo descrito em material e métodos.

Influência da concentração do anticorpo murino anti-Fc de IgG humano conjugado ao FITC na pesquisa de anticorpos anti formas promastigotas vivas: a Figura 3 mostra os resultados da reatividade de IgG total anti formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*, expressos como PFP, em mistura de soros de indivíduos não infectados (PN), de indivíduos não infectados de área endêmica para leishmaniose (PNE) e de pacientes portadores de leishmaniose (PL). A reatividade da mistura dos soros na diluição 1:1.024 foi obtida empregando-se três diluições do conjugado (1:200, 1:400 e 1:800). A análise dos resultados mostrou valores negativos de PFP para as misturas PNE nas três diluições do conjugado empregadas, enquanto para PN apenas na diluição do conjugado 1:800. Valores de

baixa reatividade (PFP ≤ 50%) foram observados para a mistura PN nas diluições do conjugado 1:200 e 1:400. A reatividade da mistura PL foi alta nas três diluições do conjugado testadas (PFP > 50%).

Influência da temperatura e do tempo de incubação na pesquisa de anticorpos anti formas promastigotas vivas: a Figura 4 mostra os resultados da reatividade de IgG total anti formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*, expressos como PFP, em mistura de soros de indivíduos não infectados (PN), de indivíduos não infectados de área endêmica para leishmaniose (PNE) e de pacientes portadores de leishmaniose (PL). A reatividade da mistura dos soros humanos nas diluições 1:256 a 1:2.048 foi obtida empregando-se diferentes condições de reação no que se refere à incubação com

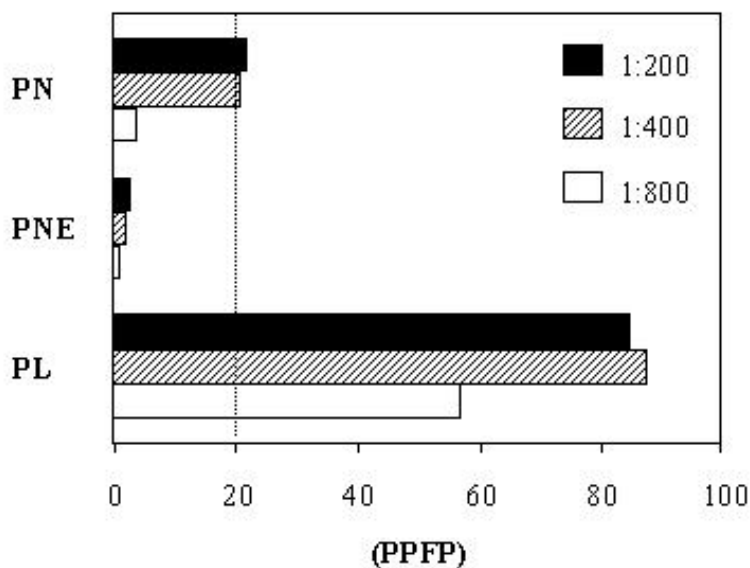


Figura 3 - Influência da concentração do anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com FITC nos valores de PPF após a incubação de promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* (10 dias de cultivo) com soro humano (1:1.024) a 37°C/30 minutos e com o anticorpo secundário anti-IgG humano a 4°C/60 minutos. Os resultados estão expressos como valores individuais de PPF para cada mistura de soros, segundo descrito em material e métodos.

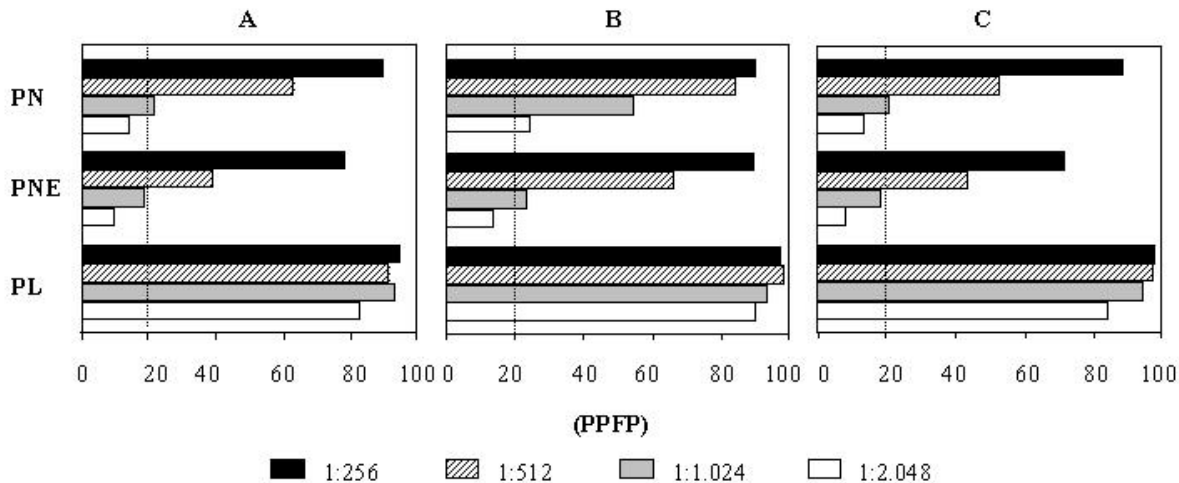


Figura 4 - Influência da temperatura e do tempo de reação com o soro (A= 37°C/30 minutos, B= 25°C/30 minutos e C=37°C/30 minutos) e com o anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com FITC, diluído 1:400 (A= 4°C/60 minutos, B= 25°C/30 minutos e C=37°C/30 minutos) nos valores de PPF após incubação de promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* (10 dias de cultivo) com soro humano em diferentes diluições. Os resultados estão expressos como valores individuais de PPF para cada mistura de soros, segundo descrito em material e métodos.

a mistura de soro e com o anticorpo secundário conjugado com FITC. Empregamos as condições 25°C por 30 minutos e 37°C por 30 minutos para a incubação das promastigotas de 10 dias com as misturas de soros e 25°C por 30 minutos, 4°C por 60 minutos e 37°C por 30 minutos para a incubação com o conjugado na

diluição 1:400, previamente padronizadas. A análise dos dados não mostrou nenhuma diferença na reatividade das misturas de soros quando incubadas a 37°C, independente das condições de incubação com o conjugado. Entretanto, a incubação com o soro e com o conjugado a 25°C por 30 minutos mostrou valores de

PPFP positivos para as mistura PN e PNE em diluições que apresentavam valores negativos de PPFP nas demais condições de incubação, mesmo na diluição do soro 1:2.048.

Influência do número de promastigotas em suspensão na pesquisa de anticorpos antiformas promastigotas de L. (V.) braziliensis: a Figura 5 mostra os resultados da reatividade de IgG total antiformas

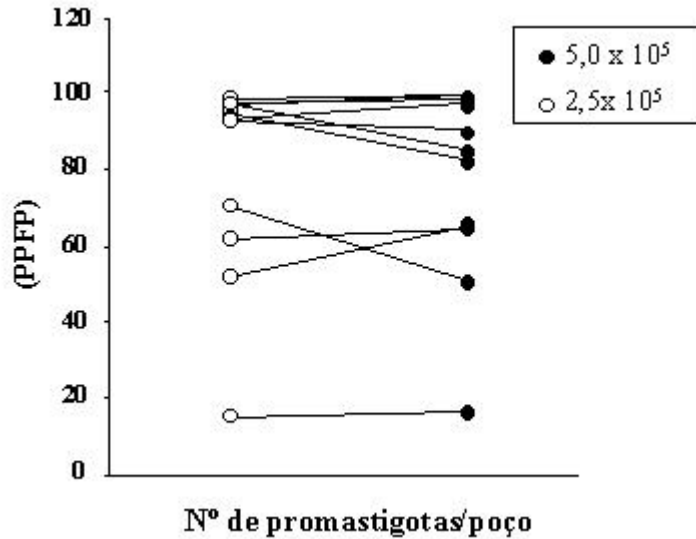


Figura 5 - Influência do número de promastigotas nos valores de PPFP após incubação de promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* (10 dias de cultivo) com soro humano (1:1.024) a 37°C/30 minutos, e com o anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com FITC (1:400) a 37°C/30 minutos. Os resultados da reatividade estão expressos como valores de PPFP para cada soro individual, segundo descrito em material e métodos.

promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*, expressos como PPFP, em soros individuais de pacientes portadores de leishmaniose, empregando-se 250.000 e 500.000 promastigotas/poroço, em condições metodológicas previamente padronizadas (mistura de soros na concentração 1:1024, conjugado na diluição 1:400 e ambas incubações 37°C por 30 minutos). A análise dos resultados não demonstrou nenhuma diferença significativa nos valores de PPFP quando foram utilizados 250.000 ou 500.000 promastigotas.

Análise do método. Análise comparativa da reatividade de IgG antiformas promastigotas vivas de *Leishmania (V.) braziliensis* e da reatividade na RIFI em soros de indivíduos com ausência ou presença de lesão: a Figura 6 mostra os resultados da reatividade de IgG total anti formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*, expressos como média dos valores de PPFP, dos soros individuais dos grupos L- e L+, classificados quanto à ausência ou presença de lesão, respectivamente. A reatividade dos soros individuais foi obtida após incubação do soro humano nas diluições (1:64 a 1:131.072) com promastigotas vivas, de 10 dias de cultivo, nas condições previamente padronizadas. Os resultados foram classificados em positivos quando PPFP > 20% e negativos quando PPFP ≤ 20%. A análise

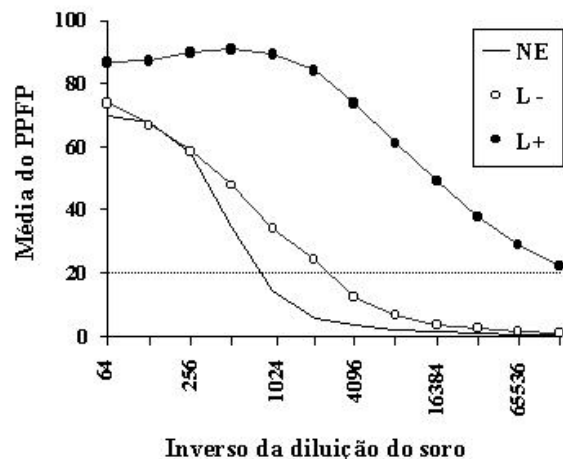


Figura 6 - Curva de titulação de anticorpos IgG antiformas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* presentes em soros de indivíduos com sorologia convencional positiva para leishmaniose, classificados quanto a ausência ou a presença de lesão (L-, n=18 e L+, n=21), e indivíduos não infectados de área endêmica (NE). Os resultados da reatividade estão expressos como média dos valores de PPFP para cada grupo avaliado, segundo descrito em material e métodos.

das curvas de titulação dos anticorpos dos soros individuais, expressos como média dos valores de PFP, demonstrou que a diluição do soro humano 1:1.024 é ideal para distinguir indivíduos não infectados (PPFP \leq 20%) de indivíduos infectados (PPFP $>$ 20%). A análise dos dados mostrou curvas de titulação de anticorpos que configuram a alta sensibilidade do teste e ainda que, o grupo L+ apresentou valor médio de PFP maior que o grupo L- em todas as diluições do soro humano. O grupo L+ apresentou valor médio de PFP positivo até a diluição 1:131.072, enquanto o grupo L- apresentou valores positivos até a diluição 1:2.048. A Figura 7 mostra os resultados da reatividade de IgG total antiformas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*, expressos como valores de PFP para amostras individuais de

soro dos grupos L- e L+, considerando a ausência ou presença de lesão, respectivamente. As Figuras 7A e B mostram as curvas de titulação de anticorpos dos indivíduos L- e L+. O estabelecimento de um limiar de reatividade de 50% de PFP permitiu a separação dos indivíduos em dois subgrupos: pacientes com alta reatividade (PPFP $>$ 50%) e indivíduos com baixa reatividade (PPFP \leq 50%). Empregando este critério, o estudo da média dos valores de PFP dos grupos L- e L+, na diluição do soro humano 1:1.024, permitiu classificar o grupo L- como de baixa reatividade e o grupo L+ como de alta reatividade (Figura 7C). A análise estatística demonstrou de forma significativa que 95% dos pacientes do grupo L+ concentram-se no grupo com alta reatividade (PPFP $>$ 50%) em contraste com o grupo L-, onde 72% dos indivíduos agrupam-se numa região de baixa reatividade (PPFP \leq 50%).

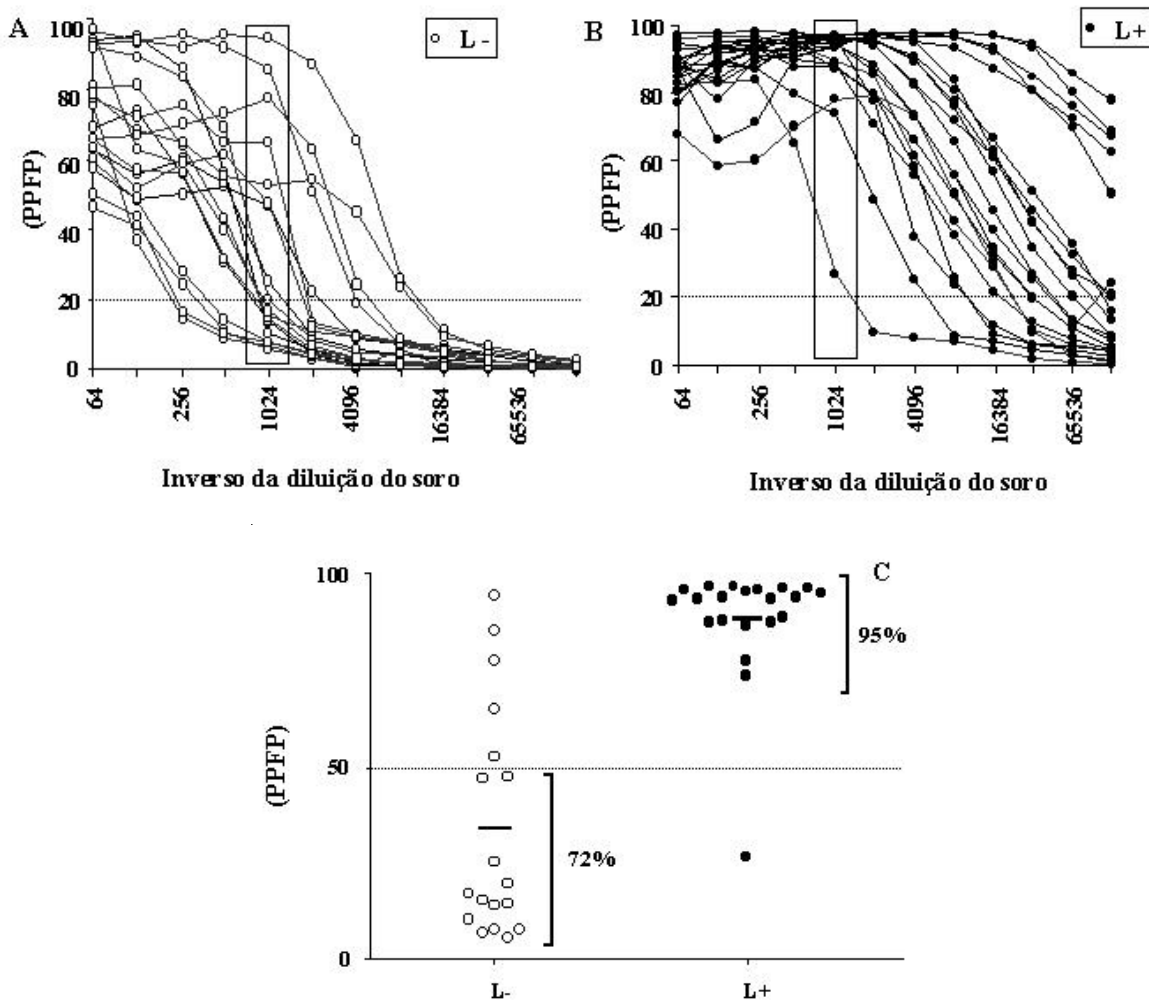


Figura 7 - Reatividade de IgG antiformas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* em soros de indivíduos com sorologia convencional positiva para leishmaniose, classificados quanto a ausência ou a presença de lesão (L-, n=18 e L+, n=21). Os resultados estão expressos como valores individuais de PFP. A reatividade de amostras individuais dos grupos L- e L+ foi avaliada ao longo da curva de titulação (A e B) e na diluição 1:1.024 selecionada (C).

Considerando as aplicabilidades da citometria de fluxo, neste estudo apresentamos dados referentes à padronização de uma metodologia para pesquisa de anticorpos anti formas promastigotas vivas de *Leishmania (V.) braziliensis*. Esta nova abordagem visa estudar a existência de uma correlação entre a resposta imune humoral e a presença de infecção ativa, proporcionando assim, uma nova perspectiva para os estudos da resposta imune humoral na LTA.

Para a padronização da metodologia, numa abordagem inicial avaliamos a reatividade de IgG total antipromastigotas vivas de *Leishmania (V.) braziliensis* em diferentes fases do crescimento em cultura, visando identificar a preparação antigênica que melhor permitiria distinguir pacientes infectados de indivíduos não infectados. No procedimento de padronização foi imprescindível identificar as condições de cultivo dos parasitas, principalmente considerando que os mesmos seriam utilizados em técnicas sorológicas. A expressão de inúmeras moléculas antigênicas, sobretudo as de superfície dos parasitas, podem sofrer mudanças, dependendo das condições de cultivo o que pode levar a perda da infectividade⁵, e principalmente a mudanças na composição antigênica dos parasitas^{11 21}. Neste contexto, avaliamos a reatividade de IgG utilizando parasitas na fase log inicial, log tardia e fase estacionária de crescimento, que correspondem a parasitas de 4, 7 e 10 dias de crescimento em cultura (Figura 2). Em todos os experimentos, a utilização de um inóculo proveniente de uma cultura em fase log inicial com menor número de passagens *in vitro* permitiu a obtenção das formas promastigotas morfológicamente mais homogêneas, com um perfil de tamanho e granulosidade bem homogêneo como o observado na Figura 1A. Nesta etapa inicial de padronização, a escolha de variáveis, tais como: o número de parasitas em suspensão (5 x 10⁵ parasitas/poço), as diluições do soro (1:1.024 a 1:4.096), a temperatura de reação (37°C por 30 minutos), a diluição do conjugado (1:400) e a temperatura de incubação (4°C por 60 minutos) baseou-se nas condições descritas por Martins-Filho et al²⁵ para a pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi*. Nossos dados mostraram que os parasitas de fase estacionária (10 dias de cultivo) foram os ideais, uma vez que estas formas promastigotas permitiram distinguir os grupos de indivíduos infectados e não infectados (Figura 2), além de ser antigenicamente mais complexas e de maior infectividade^{11 12 15 20 34 35}. Giannini¹⁵ mostrou que promastigotas da fase estacionária de cultivo são mais infectantes para hamsters que aquelas da fase log. Segundo Sacks & Perkins³⁵, na fase estacionária de crescimento dos parasitas, estão as promastigotas metacíclicas que nos meios de cultivo, resultam da diferenciação de formas promastigotas não infectantes da fase log, devido, sobretudo, à escassez de nutrientes encontrada no meio de cultura durante a fase estacionária. Doran & Herman¹¹, Franke et al¹², Sacks et al³⁴, Howard et al²⁰, trabalhando com *L. donovani*,

L. major, *L. mexicana*, respectivamente, observaram que o desenvolvimento de formas metacíclicas está associado com alterações nos carboidratos de superfície das células para ligação com lectinas^{11 36}, no aumento da resistência das promastigotas à destruição pelo soro humano¹² e na alteração da morfologia e motilidade. Embora as formas promastigotas de fase estacionária apresentem maior expressão de carboidratos, como gp63 e de LPG, que favoreciam ligações inespecíficas de anticorpos polireativos, estas reações poderiam ser minimizadas ou eliminadas através de diluições sucessivas dos soros.

No procedimento de padronização da diluição do anticorpo murino anti-Fc de IgG humano conjugado com FITC, a análise dos resultados conduziu à escolha da diluição do conjugado 1:400, a qual permitiu distinguir indivíduos não infectados de pacientes portadores de LTA, apresentando valor baixo de PFP para PN, valor negativo de PFP para PNE e maior valor de PFP para PL comparado às demais diluições do conjugado (Figura 3). A diluição 1:200 apresentou valor de PFP positivo para PN e a diluição 1:800, embora tenha apresentado valores negativos de PFP para PN e para PNE, houve uma queda no valor do PFP do PL. A temperatura de incubação com o soro humano e com o conjugado foram relevantes para a otimização dos resultados (Figura 4). Optamos pela utilização da incubação com o soro humano a 37°C por 30 minutos considerando a maior especificidade do método nesta condição em relação à incubação a 25°C. Em relação à incubação com o conjugado, a escolha da incubação a 37°C por 30 minutos, o tempo menor de incubação a 37°C foi o fator decisivo, visando otimização do tempo de reação. Também, na avaliação do número de formas promastigotas em suspensão para a pesquisa de anticorpos anti *L. (V.) braziliensis*, optamos por utilizar 500.000 promastigotas/poço, visando um procedimento de leitura mais rápido, otimizando assim a metodologia (Figura 5).

Uma vez padronizados os diferentes parâmetros que poderiam interferir na análise sorológica baseada na citometria de fluxo, realizamos uma análise comparativa entre grupos de indivíduos residentes em área endêmica para LTA, com sorologia convencional positiva para leishmaniose, classificados quanto à ausência ou à presença de lesão. O estudo de amostras individuais demonstrou que, na diluição 1:1.024, a presença de lesão estava relacionada com valores de PFP de alta reatividade (>50%), com 95% dos pacientes (20/21) classificados como de alta reatividade (Figura 7C). Embora o grupo L- tenha apresentado um padrão de resposta mais heterogêneo, com ampla dispersão de valores de PFP, observamos que 72% dos indivíduos (13/18) podiam ser agrupados em valores de PFP de baixa reatividade (≤50%) (Figura 7C). É importante ressaltar que a análise dos títulos de reatividade na RIFI não demonstrou nenhuma relação com a ausência ou presença de lesão.

É interessante observar que a reatividade do grupo L- pode representar diferentes estágios da resposta

imune, talvez associada a diferentes momentos no desenvolvimento de uma futura lesão ou casos onde houve desenvolvimento de infecção abortiva ou subclínica. Além disso, a possibilidade de reatividade cruzada não deve ser descartada. O estudo da reatividade sorológica de indivíduos apresentando lesões recentes ou lesões crônicas está ora em andamento em nosso laboratório e será importante para esclarecer a primeira hipótese. A possibilidade de esses indivíduos apresentarem lesões curadas foi descartada pela história clínica e pela ausência de lesões cicatriciais. A intradermoreação de Montenegro positiva em indivíduos de área endêmica sem história ou cicatrizes compatíveis com leishmaniose e sem qualquer lesão suspeita, aponta para a possibilidade de formas abortivas ou infecções subclínicas^{16,17,26}. Com o objetivo de melhor caracterizar a forma subclínica da

infecção iremos reavaliar o grupo L- subdividindo-o em indivíduos com teste de Montenegro positivo ou negativo. O estudo de subclasses de IgG reativos anti formas promastigotas vivas em pacientes portadores de LTA e pacientes portadores outras infecções será conduzido para identificar possíveis casos de reatividade cruzada.

Em suma, nossos resultados sugerem a aplicabilidade da citometria de fluxo para evidenciar os casos de LTA em atividade clínica, o que não tem sido possível através das reações sorológicas convencionais. Além disso, as informações geradas neste estudo abrem novas perspectivas para pesquisa sorológica na LTA e estimulam novas investigações, incluindo a análise comparativa da reatividade de anticorpos, empregando-se preparações de parasitas vivos e fixados, importantes para validar a utilização das formas promastigotas vivas nos ensaios sorológicos na LTA.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dra. Elenice Moreira Lemos, à Flávia Drumond Cordeiro e ao Dr. Alexandre Reis Barbosa pela colaboração nas etapas iniciais deste trabalho. Agradecemos ao Centro de Pesquisas René Rachou e a FAPEMIG pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barral-Netto M, Brodskyn C, Carvalho EM, Barral A. Human_Leishmaniasis@cytokines.bahia.br. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 31: 149-155, 1998.
- Brito MEF, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FGC. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by Immunoblot analysis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 7: 318-321, 2000.
- Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Bacellar O. Immunoregulation in leishmaniasis. Ciência e Cultura 46: 441-445, 1994.
- Castes M, Tapia FJ. Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis. Acta Científica Venezolana 49: 42-56, 1998.
- Chang KP, Dunne F, Bray RS. Biology of *Leishmania* and Leishmaniasis. In: Chang KP, Bray RS (eds) Leishmaniasis, Elsevier Science Publishers B.V. Shannon, Ireland, p.490, 1985.
- Chiaromonte MG, Frank FM, Furer GM, Taranto NJ, Margni RA, Malchiodi EL. Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. Acta Tropica 72: 295-308, 1999.
- Chiari CA, Magalhães PA, Mayrink W. Pesquisa de anticorpos, por imunofluorescência, em soros de pacientes com leishmaniose tegumentar americana apresentando lesões cutâneas recentes. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 15:304-309, 1973.
- Chiari CA, Mayrink W, Magalhães PA. Reação de Imunofluorescência indireta no controle de tratamento da Leishmaniose tegumentar americana. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 15: 298-303, 1973.
- Convit J, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, Rondón AJ. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 87: 444-448, 1993.
- Cordeiro FD, Martins-Filho OA, Rocha MOC, Adad SJ, Corrêa-Oliveira R, Romanha AJ. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 8: 112-118, 2001.
- Doran TI, Herman R. Characterization of populations of promastigotes of *Leishmania donovani*. Journal of Protozoology 28: 345-350, 1981.
- Franke ED, Mcgreevy PB, Katz SP, Sacks DL. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. Journal of Protozoology 134: 2713-2718, 1985.
- Fundação Nacional de Saúde. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil de 1980 a 1998. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br >. Acesso em: 01/08/2002. Boletim Epidemiológico - Edição especial, Brasília, 3:15-16, 1999.
- Garcia-Miss MR, Andrade-Narvaez FJ, Esquivel-Viñas RE, Simmonds-Diaz EB, Canto-Lara SB, Cruz-Cruz AL. Localized cutaneous leishmaniasis (chiclero's ulcer) in Mexico: sensitivity and specificity of ELISA for IgG antibodies to *Leishmania mexicana mexicana*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 84:356-358, 1990.
- Giannini MS. Effects of promastigote growth phase, frequency of subculture and host age on promastigote-initiated infections with *Leishmania donovani* in the golden hamster. Journal of Protozoology 21: 521-525, 1974.
- Guedes ACM, Cucé LC, Furtado T. Avaliação imunológica e histopatológica de reação de Montenegro. Anais Brasileiros de Dermatologia 65:345-405, 1990.
- Guerra MOP, Furtado T, Barros GC, Sessa PA, Daher VR. Infecção subclínica na leishmaniose tegumentar americana. Anais Brasileiros de Dermatologia 60:365-369, 1985.
- Guimarães MCS, Celeste BJ, Franco EL. Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays

- of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. Bulletin of the World Health Organization 68: 39-43, 1990.
19. Guimarães MCS, Celeste BJ. Performance indexes of a dot-enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) and an enzyme linked immunosorbent assay (IgG-ELISA) for field surveys of new world leishmaniasis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 33: 385-389, 1991.
 20. Howard MK, Sayers G, Miles MA. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes; transformation *in vitro*, lectin agglutination, complement resistance and infectivity. Experimental Parasitology 64: 147-156, 1987.
 21. Jaffe CL, McMahon-Pratt D. The identification of membrane glycoconjugates in *Leishmania* species. Journal Parasitology. 74: 548-561, 1988.
 22. Jensen ATR, Gaafar A, Ismail A, Christensen CBV, Kemp M, El Hassan AM, Kharazmi A, Theander TG. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis: assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay using a peptide sequence from gene B protein. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 55: 490-495, 1996.
 23. Kar K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. Critical Reviews in Microbiology 21: 123-152, 1995.
 24. Malchiodi EL, Chiamonte MG, Taranto NJ, Zwirner NW, Margni RA. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified (Ag163B6). Clinical Experimental Immunology 97: 417-423, 1994.
 25. Martins-Filho OA, Pereira MES, Carvalho JF, Cançado JR, Brener Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 2: 569-573, 1995.
 26. Martins-Netto E. Avaliação de procedimentos imunodiagnósticos numa área endêmica de leishmaniose tegumentar na Bahia. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia. Salvador, 1990.
 27. Mendonça SCF, Souza WJS, Nunes MP, Marzochi MCA, Coutinho SG. Indirect immunofluorescence test in new world leishmaniasis: serological and clinical relationship. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 83: 347-355, 1988.
 28. Moll H, Ritter U, Flohé S, Erb K, Bauer C, Blank C. Cutaneous leishmaniasis: a model for analysis of the immunoregulation by accessory cells. Medical Microbiology and Immunology 184: 163-168, 1996.
 29. Mosleh IM, Saliba EK, al-Khateeb MS, Bisharat Z, Oumeish OY, Bitar W. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in Jordan using indirect fluorescent antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. Acta Tropica 59: 163-172, 1995.
 30. O'Neil CE, Labrada M, Saraiva NG. *Leishmania (Viannia) Panamensis*-specific IgE and IgA antibodies in relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. The American of Tropical Medicine and Hygiene 49: 181-188, 1993.
 31. Organización Panamericana de la Salud. Las leishmaniasis en las Américas. Washington, Organización Panamericana de la Salud 8-13, 1994.
 32. Quijada L, Requena JM, Soto M, Alonso C. Analysis of the antigenic properties of the *L. infantum* Hsp 70: design of synthetic peptides for specific serodiagnosis of human leishmaniasis. Immunology Letters 63: 169-174, 1998.
 33. Rodríguez V, Centeno M, Ulrich M. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. Parasite Immunology 18: 341-345, 1996.
 34. Sacks DL, Hieny S, Sher A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. The Journal of Immunology 105: 564-569, 1985.
 35. Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania*. Science 223: 1417-1419, 1984.
 36. Shaw JJ, Lainson R. A simply prepared amastigote leishmanial antigen for use in the indirect fluorescent antibody test for leishmaniasis. Journal Parasitology 63: 384-385, 1977.
 37. Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 3: 387-391, 1996.
 38. Ulrich M, Centeno M, Mattout Z, Convit J. Serological patterns and specificity in American cutaneous leishmaniasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 39: 179-184, 1988.
 39. Valli LCP, Passos VMA, Dietze R, Callahan HL, Berman JD, Groggi M. Humoral immune responses among mucosal cutaneous leishmaniasis patients caused by *Leishmania braziliensis*. Journal Parasitology 85: 1076-1083, 1999.
 40. Walton BC, Brooks WH, Arjona I. Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 21: 296-299, 1972.
 41. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. World Health Organization, Geneva, 1990.