

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Strictu sensu* EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Evolução pós-tratamento de pacientes infectados por
duas espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*: *L.*
braziliensis e *L. naiffi***

Giselle Aparecida Fagundes Silva

Rio de Janeiro

Agosto de 2015

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Strictu sensu* EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Evolução pós-tratamento de pacientes infectados por duas espécies de
Leishmania do subgênero *Viannia*: *L. braziliensis* e *L. naiffi***

Giselle Aparecida Fagundes Silva

Orientadora: Alda Maria Da-Cruz

Tese apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biologia
Parasitária

Rio de Janeiro

Agosto de 2015

S586 Silva, Giselle Aparecida Fagundes

Evolução pós-tratamento de pacientes infectados por duas espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*: *L. braziliensis* e *L. naiffi* / Giselle Aparecida Fagundes Silva. – Rio de Janeiro, 2015.
xviii,91 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.
Bibliografia: f. 72-91

1. *Leishmania braziliensis*. 2. *Leishmania naiffi*. 3. Tratamento. 4. Memória. I. Título.

CDD 616.9364

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Strictu sensu* EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Evolução pós-tratamento de pacientes infectados por duas espécies de
Leishmania do subgênero *Viannia*: *L. braziliensis* e *L. naiffi*

Por: Giselle Aparecida Fagundes Silva
Orientadora: Dra. Alda Maria Da-Cruz

EXAMINADORES:

PROFA. DRA. FÁTIMA DA CONCEIÇÃO SILVA (PRESIDENTE DA BANCA, IOC/FIOCRUZ)

PROFA. DRA. CLARISSA MENEZES MAYA-MONTEIRO (IOC/FIOCRUZ)

PROFA. DRA. CAMILA INDIANI DE OLIVEIRA (LIP/FIOCRUZ)

PROF. DR. ALVARO LUIZ BERTHO DOS SANTOS (SUPLENTE, IOC/FIOCRUZ)

PROF. DR. JORGE AUGUSTO DE OLIVEIRA GUERRA (SUPLENTE, FMT-HVD)

RIO DE JANEIRO, 31 DE AGOSTO DE 2015

“O bom Deus não me inspiraria desejos irrealizáveis”.

(Sta Terezinha do Menino Jesus)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da minha vida. Obrigada por estar sempre comigo e permitir com que pessoas tão especiais trilhassem meu caminho. Obrigada pelas oportunidades e por ficar junto de mim nos momentos mais difíceis, Sem o teu amor e o teu olhar, eu nunca teria conseguido chegar até aqui.

Ao meu marido Cristiano, por toda compreensão, carinho e afeto nos momentos mais difíceis do doutorado. Por toda palavra amiga, pelas vezes que zelou e acreditou em mim. Eu serei grata eternamente. Te amo e sou muito melhor ao seu lado.

Aos meus pais, que me deram a vida e dentro de suas poucas possibilidades me concederam o melhor que eles poderiam me dar: a educação. Obrigada pela confiança, por sempre acreditarem nos meus estudos e pelo amor incondicional que vocês têm por mim. A vocês, todo meu amor e dedicação.

À Dra. Alda, a pessoa que me acolheu não apenas como aluna, mas como mãe (as semelhanças estão aí para comprovar isso). Agradeço-lhe pela amizade, pela dedicação, pela confiança e pelo carinho.

Ao Dr. Adriano Gomes da Silva, que vem acompanhando minha caminhada desde a iniciação científica, e que hoje é meu co-orientador. Obrigado pela dedicação, pela paciência, pelos desabafos, conversas e risadas. Obrigado por ter sido muito mais que um colega de trabalho, mas um amigo, um padrinho e até mesmo um irmão.

À Dra. Joanna Reis, pela sua amizade, carinho, parceria e por toda contribuição científica que você trouxe para a minha vida. Obrigada pelos momentos de alegria e tristezas que passamos juntas e por ter me agraciado de ter um elo eterno contigo, minha querida madrinha.

À Dra. Fatima da Conceição Silva, por prontamente ter aceitado ser minha revisora. Obrigada pela dedicação e paciência.

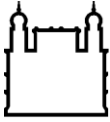
Agradeço aos alunos e bolsistas Rosa Plácido, Andrea Saavedra, Luzinei Couto, Maria Fantinatti, Phelipe Austríaco, Tiara Cascais, Luciana Freitas, Samyra Almeida, Sabrina Guimarães, Milene Yoko, Clébio Eleutério. Obrigada pelos almoços divertidos, pelas conversas, pelas festas, pelo apoio e força neste momento.

Aos pesquisadores Ricardo Nogueira, Eduardo Pinto, Raquel Peralva, pela amizade e por toda contribuição na minha formação. À Josiane Costa pelo carinho, pelas “xerox”, cópias, formulários, e toda a parte burocrática.

A toda equipe que pertence à Gerência de Leishmaniose na FMT-HVD, especialmente a Yolanda Noguth e o Dr. Jorge Guerra.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED) por ter me acolhido e fornecido toda a estrutura necessária ao desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação da Biologia Parasitária pela confiança, e ao IOC e a FAPEAM pelo apoio financeiro.

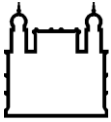


Evolução pós-tratamento de pacientes infectados por duas espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*: *L. braziliensis* e *L. naiffi*

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

RESUMO

A principal estratégia para controlar a leishmaniose tegumentar Americana (LTA) seria a imunoprofilaxia. Entretanto, até o momento ainda não existe uma vacina, dificultando o controle da doença. Ademais, ainda não se conhece quais são as condições que contribuem para que indivíduos infectados evoluam sem desenvolver sinais clínicos da doença, apresentem insucesso terapêutico, ou que venham a desenvolver a forma mucosa da leishmaniose. O propósito desta tese foi avaliar a evolução pós-tratamento de casos de infecção por *Leishmania naiffi* (*Ln*) e *L. braziliensis* (*Lb*) sob dois aspectos diferentes: 1) descrever uma série de casos de LTA causados por *Ln* selecionados dentre trinta pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, no período de 2011 a 2013. 2) avaliar se a assinatura imunológica, em termos de subclasses de imunoglobulina e perfil de diferenciação celular e memória, é similar entre pacientes de *Lb* com até 26 anos de cura após tratamento com dois diferentes esquemas terapêuticos com antimônio. Foram estudados 43 pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC), sendo estes divididos em dois grupos: pacientes de LCC acompanhados desde a fase ativa até três anos (a) após cura da infecção por *Lb* (n= 23, LCC<3a) e pacientes LCC com até 26 anos de cura da infecção por *Lb* (n= 12, LCC 12-26a). Além disso, 30 isolados de *Leishmania* de pacientes de leishmaniose cutânea (LC) proveniente da FMT-HVD foram avaliados. Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram analisadas após estímulo *in vitro* com antígenos de *Lb*. A fenotipagem das subpopulações de linfócitos T foi realizada através da citometria de fluxo quanto à ativação, imunosenescência e memória imunológica. A produção de IgG e suas subclasses anti-*Leishmania* foram avaliadas por ELISA. Os isolados de *Leishmania* foram caracterizados quanto à espécie pela técnica de isoenzimas. A presença do *Leishmania* RNA vírus (LRV) na *Ln* foi avaliada por sequenciamento. Após a cura clínica foi observada uma redução dos níveis de IgG1 e IgG3 anti-*Lb* ($p<0.0001$). O tempo de cura clínica neste estudo correlacionou-se negativamente com os valores de Índice de ELISA (IE) obtidos a partir de amostras de LCC<3a, para IgG ($r= -0.79$; $p<0.0001$), IgG1 ($r=-0.64$, $p<0.001$) e IgG3 ($r= -0.4$; $p<0.05$). As CMSP dos compartimentos de memória dos LCC 12-26a apresentaram aumento da ativação das células TME e TMC ($p<0.05$) frente aos antígenos de *Lb*, apesar de não ter sido observado expansão destes compartimentos. Foi observada uma frequência de 26,7% da *Ln* entre os isolados de LC. Ademais, dois pacientes de *Ln* evoluíram com falha terapêutica após o tratamento com antimonial ou pentamidina. Em um caso clínico foi descrita uma possível associação entre o LRV presente na *Ln* e o insucesso terapêutico por pentamidina. Os resultados acima indicam que: (1) após longo tempo de cura ocorre uma modulação da reposta imune de memória capaz de manter suas células ativadas, mas não expandir seus compartimentos frente a uma nova estimulação antigênica específica. Além disso, a IgG1 e IgG3 surge como uma importante ferramenta a ser utilizada no acompanhamento clínico dos pacientes. (2) Os casos de LTA por *Ln* podem não ser tão raros e nem ter um caráter benigno como é descrito na literatura. Estudos posteriores na região Amazônica poderão fornecer mais informação sobre a LTA causada por *L. naiffi*.



Post-treatment evolution of patients infected by *Leishmania* species of subgenus *Viannia*: *L. braziliensis* and *L. naiffi*

PHD TESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

ABSTRACT

The main strategy to control American tegumentary leishmaniasis (ATL) is immunoprophylaxis. To date, no vaccine is available to control spread of the disease. Moreover, is still unknown what are the conditions that contribute to infected individuals evolve without developing clinical signs of disease, presenting therapeutic failure, or otherwise, will develop mucosal leishmaniasis. Thus, the purpose of this thesis was to evaluate the evolution of post-treatment cases of infection with *Leishmania naiffi* (*Ln*) and *L. braziliensis* (*Lb*) under two different aspects: 1) describe a series of cases of ATL caused by *Ln* selected from thirty cutaneous leishmaniasis (CL) patients attend at the FMT-HVD, Manaus, in the period 2011-2013. 2) Evaluating the immunological signature, in terms of immunoglobulin subclasses and differentiation profile and memory is similar between patients *Lb* with 26 years of healing after treatment with two different treatment regimens with antimony. We studied 43 patients cured cutaneous leishmaniasis (CCL), which are divided into groups: CCL patients followed from the active phase to three years (y) after cure of *Lb* infection (n= 23, CCL<3y), CCL patients healed with up 26 years after infection by *Lb* (n= 12, CCL 12-26y). In addition, 30 isolates of *Leishmania* of patients with cutaneous leishmaniasis (CL) from FMT-HVD were evaluated. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were analyzed after *in vitro* stimulation with antigen *Lb*. The phenotyping of T lymphocyte subpopulations was performed by flow cytometry for the activation, immunological memory and immunosenescence. The production of IgG and its subclasses anti-*Lb* were evaluated by ELISA. Isolates of *Leishmania* were characterized as to species by isozyme technique. The presence of LRV in *Ln* was evaluated by sequencing. After clinical cure was observed a reduction in the levels of IgG1 and IgG3 anti-*Lb* ($p<0.0001$). The time of cure this clinical study was negatively correlated with the EI values obtained from CCL<3y samples for IgG ($r= -0.79$; $p<0.0001$), IgG1 ($r = -0.64$, $p<0.001$) and IgG3 ($r= -0.4$, $p<0.05$). PBMC of CCL 12-26y patients showed increased activation of TEM and TCM cells ($p<0.05$) when stimulated with *Lb* antigens, despite not having been observed expansion of these compartments. A frequency 26.7% of *Ln* between CL isolates was observed. In addition, two *Ln* patients progressed with treatment failure after treatment with antimony or pentamidine. In a clinical case was described a possible association between the LRV present in *Ln* and therapeutic failure by pentamidine. The above results indicate that: (1) after long time healing there is a modulation of the immune response of memory able to maintain its activated cells but not expand its compartments front of new specific antigen stimulation. Moreover, IgG1 and IgG3 appear as an important tool to be used in clinical patient monitoring. (2) cases of LTA by *Ln* may not be as rare and even have a benign character as described in the literature. Later studies in the Amazon region may provide more information about ATL caused by *L. naiffi*.

ÍNDICE

1. RESUMO.....	vii
2. ABSTRACT.....	viii
3. LISTA DE ABREVIACES E SBOLOS.....	xi
4. LISTA DE ARTIGOS, TABELAS, FIGURAS E ANEXO.....	xiv
5. JUSTIFICATIVA.....	xv
6. PREFCIO.....	xvii
7. CAPÍTULO 1 – INTRODUO.....	1
7.1 Epidemiologia das leishmanioses	2
7.2 Leishmaniose tegumentar Americana.....	3
7.3 Aspectos clínicos da infeco por <i>Leishmania braziliensis</i>	3
7.4 Tratamento da leishmaniose tegumentar Americana causada por <i>L.braziliensis</i>	4
7.5 Definio de cura na Leishmaniose tegumentar Americana.....	5
7.6 Resposta imune: patogênese x cura na Leishmaniose tegumentar Americana.....	6
7.7 Memória imunológica na leishmaniose tegumentar.....	11
8. OBJETIVOS.....	15
9. Objetivo geral.....	15
10. Objetivos específicos.....	15
11. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
12. Artigo 1 (Publicado).....	16
13. APÊNDICES DE RESULTADOS.....	25
14. DISCUSSO GERAL DO CAPÍTULO 1.....	36
15. CONCLUSES DO CAPÍTULO 1.....	41
16. CAPÍTULO 2	42

16.1 Leishmaniose tegumentar Americana causada por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	43
16.2 Leishmaniose tegumentar Americana causada por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	45
16.3 Leishmaniose tegumentar Americana causada por <i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	47
17. OBJETIVOS.....	49
18. Objetivo geral.....	49
19. Objetivos específicos.....	49
20. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
21. Artigo 2 (Publicado).....	50
22. Manuscrito 1.....	56
23. DISCUSSÃO GERAL DO CAPÍTULO 2.....	65
24. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 2.....	69
25. CONCLUSÕES.....	70
26. CAPÍTULO 3 – Referências bibliográficas.....	71
27. ANEXOS.....	92

1. Lista de abreviações e símbolos

a – Anos

aCL – Do inglês, *Active phase of cutaneous leishmaniasis* (fase ativa da leishmaniose cutânea)

Ag-Lb – Antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

APC – Do inglês, *Antigen presenting cell* (célula apresentadora de antígeno)

ATL – Do inglês, *American tegumentary leishmaniasis* (Leishmaniose tegumentar Americana)

CCR – Do inglês, *CC chemokine receptor* (receptor para quimiocina da família CC)

CD – Do inglês, *Cluster of differentiation* (aglomerado de diferenciação)

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CL – Do inglês, *Cutaneous leishmaniasis* (leishmaniose cutânea)

CMSP – Células mononucleares do sangue periférico

CTLA-4 – Do inglês, *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (antígeno de linfócito T citotóxico – 4)

CTR – indivíduo controle

CXCL – Do inglês, *Chemokine (C-X-C)* (quimiocina da família CXC)

Cut-off – Ponto de corte

DB – Dose baixa de antimonial

DC – Dose convencional de antimonial

DNA – Do inglês, *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

EI – Do inglês, *ELISA index* (índice ELISA)

ELISA – Do inglês, *Enzyme linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático indireto)

Fc γ – Do inglês, *Fc-gamma* (porção Fc de cadeia gama da imunoglobulina)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

Foxp3 – Do inglês, *Forkhead boxp3* (fator transcricional *foxp3*)

FMT-HVD – Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado

hCL – Do inglês, *Clinical healing of CL* (leishmaniose cutânea curada)

HLA – Do inglês, *Human leukocyte antigen* (antígeno leucocitário humano)

HS – Do inglês, *Healthy subjects* (indivíduos saudáveis)

IDRM – Intradermoreação de Montenegro

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IFN- γ – Do inglês, *Interferon gamma* (interferon gama)

IgG – Do inglês, *Immunoglobulin G* (imunoglobulina G)

IL – Do inglês, *Interleukin* (interleucina)

IL-12R β 2 – Do inglês, *Interleukin 12 receptor, beta 2 subunit* (cadeia β 2 do receptor de IL-12)

ICAM-1 – Do inglês, *Intercellular adhesion molecule 1* (molécula de adesão intercelular-1)

IPEC – Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (atualmente INI)

INI – Instituto Nacional de Infectologia

Lb – *Leishmania braziliensis*

LC – Leishmaniose cutânea

LCC – Leishmaniose cutânea curada

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LC-Lb – pacientes de leishmaniose cutânea infectados por *Leishmania braziliensis*

LC-Lg – pacientes de leishmaniose cutânea infectados por *Leishmania guyanensis*

LFA-1 – Do inglês, *Lymphocyte function-associated antigen 1* (antígeno 1 associada a função leucocitária)

Lg – *Leishmania guyanensis*

LM - Leishmaniose mucosa

Ln – *Leishmania naiffi*

LRV – *Leishmania* RNA virus

LTA – Leishmaniose tegumentar Americana

ME – memória efetora

MC – memória central

MHC – Do inglês, *Major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)

MIF – Do inglês, *Macrophage migration Inhibitory Factor* (fator inibitório de migração de macrófagos)

MLEE – Do inglês, *MultiLocus Enzyme Electrophoresis* (eletroforese de multilocus enzimático)

MLMT – Do inglês, *Multilocus microsatellite typing* (sequenciamento por multilocus)

MyD88 – Do inglês, *Myeloid differentiation primary response gene 88* (gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88)

MS – Ministério da Saúde

NK – Do inglês, *Natural killer*

One-way ANOVA – Do inglês, *one-way analysis of variance* (análise de variância simples)

OPD – Do inglês, *O-phenylenediamine dihydrochloride* (o-fenilenodiamina di-hidrocloreto)

PBMC – Do inglês, *Peripheral blood mononuclear cell* (células mononucleares do sangue periférico)

PBS – Do inglês, *Phosphate buffered saline* (salina tamponada com fosfato)

RNA – Do inglês, *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

Sb⁺⁵ – Antimonial pentavalente

SINAN – Sistema de informação de agravos de notificação

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

TGF-β – Do inglês, *Transforming growth factor beta* (fator de crescimento tumoral beta)

Th1 – Do inglês, *T helper cell type 1* (linfócito T auxiliar do tipo 1)

Th2 – Do inglês, *T helper cell type 2* (linfócito T auxiliar do tipo 2)

Th3 – Do inglês, *T helper cell type 3* (linfócito T auxiliar do tipo 3)

Th17 – Do inglês, *T helper 17 cell* (linfócito T auxiliar produtor de interleucina 17)

TEM – Do inglês, *Effector memory T cells* (linfócito T de memória efetora)

TEMRA – Do inglês, *T differentiated effector memory* (linfócito T de memória efetora altamente diferenciada)

TCM – Do inglês, *Central memory T cells* (linfócito T de memória central)

TLR – Do inglês, *Toll-like receptor* (receptor do tipo Toll)

TMC – Linfócito T de memória central

TME – Linfócito T de memória efetora

TNF – Do inglês, *Tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

VCAM-1 – Do inglês, *Vascular cell adhesion protein* (molécula de adesão celular vascular-1)

Tr1 – Do inglês, *Regulatory T cells type 1* (células T regulatórias do tipo 1)

Treg – Do inglês, *Regulatory T cells* (células T regulatórias)
VLA-4 – Do inglês, *Very Late Antigen-4* (antígeno 4 da ativação tardia)

2. Lista de artigos, manuscritos, tabelas, figuras e anexos

- ARTIGO 1 – “Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous *Leishmaniasis* lesion healing is correlated with the time of clinical cure”.....(Página 16)
- ARTIGO 2 – “*Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected?”(Página 50)
- MANUSCRITO 1 – “First report of treatment failure in a cutaneous leishmaniasis patient infected by *Leishmania (Viannia) naiffi*”(Página 56)
- QUADRO 1 – Fenótipo/Função de linfócitos T e seus marcadores(Página 28)
- TABELA 1 – Dados demográficos e clínicos de pacientes curados de leishmaniose cutânea(Página 31)
- FIGURA 1 – Análise representativa da citometria de fluxo realizada em células mononucleares estimuladas com antígenos de *Leishmania braziliensis*.....(Página 29)
- FIGURA 2 – Avaliação numérica dos compartimentos de memória efetora e memória central em pacientes curados de leishmaniose.....(Página 32)
- FIGURA 3 – Avaliação dos níveis de ativação e senescência do compartimento de memória efetora em pacientes curados de leishmaniose.....(Página 34)
- ANEXO 1 – Parecer do comitê de ética em pesquisa em humanos(Página 92)

JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar Americana (LTA) é uma doença causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, constituindo-se um importante problema de saúde pública no Brasil, principalmente devido ao fato de todas as unidades federadas terem notificação da doença. Na região Amazônica este problema é bem ilustrado uma vez que pelo menos sete espécies dermatrópicas de *Leishmania* são responsáveis por casos humanos. Diferente do que ocorre em outras áreas endêmicas, como no Rio de Janeiro, onde a *L. braziliensis* é a principal espécie presente na região.

Embora a apresentação clínica da LTA seja geralmente similar, independente das espécies de *Leishmania* spp envolvidas, tem sido descritas peculiaridades associadas a características clínico-parasitológicas, imunopatogênese, resposta terapêutica e prognóstico dos pacientes. Isto significa que a infecção/doença causada por cada espécie deve ser compreendida dentro do binômio espécie-hospedeiro, não cabendo generalizar o entendimento que já se tem sobre a *L. braziliensis*.

O aumento da falha terapêutica aos antimoniais, que vem sendo reportado principalmente na região Amazônica e em áreas endêmicas da Bahia, constitui um desafio a mais para a saúde pública. Em paralelo, não dispomos na prática clínica de ferramentas laboratoriais que possam prever a falha terapêutica, o que faz com que a avaliação prognóstica destes pacientes seja baseada somente na clínica. Não raro, toma-se conhecimento que a maioria dos estudos sobre esta temática está relacionada à *L. braziliensis*, visto que esta espécie é a mais frequente e de maior distribuição geográfica no país. Pouco se sabe sobre a resposta terapêutica de casos relacionados às espécies de menor prevalência, como por exemplo, a *L. naiffi*. Visto que a taxa de cura na região Amazônica é uma das mais baixas no país, a avaliação de casos de leishmaniose causada por *L. naiffi*, com ênfase na evolução dos pacientes após o tratamento da leishmaniose poderá avaliar se esta espécie pode estar contribuindo para estes elevados índices de falha terapêutica, e com isso dar uma maior importância para esta no cenário da LTA.

Em um período de até cinco anos pós-tratamento, estima-se que o percentual de indivíduos infectados por *L. braziliensis* que apresentam um prognóstico desfavorável, i.e. recidivas ou evolução para LM, seja inferior a 10%. Este fato nos leva a hipotetizar

que na maioria dos indivíduos a resposta imune que se estabelece após a resolução da infecção é capaz de manter uma cura clínica estável e possível proteção a uma nova exposição ao parasito. Portanto, seria desejável que um candidato vacinal também fosse capaz de induzir uma assinatura imunológica semelhante à destes indivíduos.

Dessa forma, o propósito desta tese foi avaliar a evolução pós-tratamento de casos de infecção por *L. naiffi* e *L. braziliensis* sob dois aspectos:

1) descrever uma série de casos de LTA causado por *L. naiffi* selecionados dentre trinta pacientes que tiveram seus isolados de *Leishmania* sp caracterizados quanto a espécie por isoenzimas.

2) avaliar se a assinatura imunológica, em termos de subclasses de imunoglobulina e perfil de diferenciação celular e memória, é similar entre pacientes de *L. braziliensis* longo tempo após tratamento com dois diferentes esquemas terapêuticos com antimônio .

Prefácio

Esta tese está organizada da seguinte forma:

Capítulo 1: Leishmaniose tegumentar Americana causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Neste capítulo, encontram-se informações extraídas da literatura, sobretudo sob o aspecto da resposta imune celular e humoral relacionados à Leishmaniose tegumentar Americana causada por *L. braziliensis*. São abordados temas como a cura e a patogenia da doença. Além disso, estão incluídos fundamentos teóricos sobre o tratamento, memória imunológica e mecanismos de regulação da resposta imune. Também foram incluídos neste capítulo os objetivos gerais e específicos referentes a este assunto. Encontram-se aqui um artigo que compõem a tese, substituindo os tópicos Metodologia e Resultados, além da discussão e resultados adicionais que ainda não foram organizados sob a forma de manuscrito.

Capítulo 2: Desafios atuais na LTA: particularidades inerentes as diferentes espécies de *Leishmania* que circulam na região Amazônica.

Neste capítulo, encontram-se informações gerais sobre a Leishmaniose tegumentar Americana causada por *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. naiffi*. O destaque deste módulo é a infecção por *L. naiffi*, com enfoque na importância clínica e epidemiológica desta espécie na região Amazônica. Além disso, os objetivos gerais e específicos referentes a este assunto também foram incluídos neste capítulo. Encontram-se aqui ainda um artigo e um manuscrito que compõem a tese, substituindo os tópicos Metodologia e Resultados, além da discussão.

Capítulo 3: Referências bibliográficas

Anexo: Documento de aprovação do comitê de ética em pesquisa em humanos.

CAPÍTULO 1

A leishmaniose tegumentar Americana segundo
a espécie *Leishmania braziliensis*

INTRODUÇÃO

Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são parasitoses causadas por protozoários de transmissão vetorial. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estas enfermidades estão incluídas entre as seis mais importantes doenças infecciosas, constituindo um problema de saúde pública. Atualmente, as doenças afetam 98 países distribuídos por cinco continentes, totalizando uma incidência anual estimada entre 0,7 e 1 milhão de casos de leishmaniose cutânea e entre 200 e 400 mil casos de leishmaniose visceral (Alvar *et al.*, 2012). No entanto, é bastante difícil ter estimativas exatas quanto às incidências e prevalências em todo o mundo, uma vez que os casos reportados são muito inferiores aos que realmente ocorrem. Essa subnotificação pode estar relacionada a alguns fatores como: as leishmanioses não serem doenças de notificação obrigatória em muitos países; a ausência de técnicas de diagnóstico ou imprecisão das mesmas em algumas localizações (Desjeux, 2004).

Historicamente, a leishmaniose tegumentar constitui uma zoonose típica, com reservatórios silvestres e vetores bem definidos, enquanto os humanos assumem o papel de hospedeiros acidentais. Entretanto, devido principalmente ao crescimento da população, urbanização, mudanças ambientais e migração (êxodo rural), a integração do homem no ciclo passou a ser cada vez maior. Assim, a infecção tem se dado em diversas áreas num ambiente peridomiciliar ou até mesmo domiciliar, onde a adaptação do vetor permite a transmissão do parasito para animais domésticos e para o homem, fazendo com que a probabilidade da infecção seja semelhante à observada para a população de risco, não importando a faixa etária, sexo ou atividade profissional (SVS/MS, 2007).

Em todo o mundo, tem sido observado um aumento da dificuldade no manejo dos casos de Leishmaniose tegumentar Americana (LTA) devido a fatores como a resistência do parasito às drogas, adversidades relativas ao diagnóstico, baixo arsenal terapêutico, crescimento dos casos com apresentações clínicas anteriormente pouco comuns (Ex. leishmaniose disseminada) e associação a outras doenças como pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Da-Cruz *et al.*, 2000, Fernández *et al.*, 2014). Além disto, há a possibilidade de evolução para formas mais graves como formas

metásticas cutâneas ou mucosas conhecidas como leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucosa (LM), respectivamente.

Leishmaniose tegumentar Americana

O termo leishmaniose tegumentar designa a infecção pelo protozoário *Leishmania* spp que acomete a pele e mucosa. A (LTA) é uma doença de grande importância em saúde pública no Brasil, tendo ampla distribuição pelo território nacional, onde são registrados cerca de 20.000 novos casos da doença por ano (SINAN, 2013).

As principais espécies causadoras da LTA no Brasil são *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. A *L. braziliensis* é a espécie de maior distribuição pelo território. No entanto, vem aumentando a ocorrência de casos causados por outras espécies como, por exemplo, a *L. (V.) naiffi* na região Amazônica (Figueira *et al.*, 2008, 2014). A LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo o grau de acometimento tecidual diretamente relacionado aos mecanismos patogênicos que se estabelecem em decorrência da interação entre o parasito e o hospedeiro vertebrado.

Aspectos clínicos da infecção por Leishmania braziliensis

A infecção pela *L. braziliensis* (*Lb*) nem sempre resulta em manifestações clínicas aparentes. A maior parte dos pacientes de LTA evolui com leishmaniose cutânea (LC), mas a ocorrência de infecção assintomática ou subclínica mostram que as populações em risco podem ser expostas ao parasito e adquirir a infecção sem desenvolver a doença (Souza *et al.*, 1992, de Oliveira-Neto *et al.*, 2000, Silveira *et al.*, 2004, Bittar *et al.*, 2007, Jirmanus *et al.*, 2012, Guerra *et al.*, 2015).

A LC é a forma clínica mais frequente e tem como principal manifestação uma lesão ulcerada que se desenvolve no sítio de inoculação do parasito. As lesões são geralmente únicas ou em pequeno número e usualmente apresentam um bom prognóstico, podendo ser curadas espontaneamente ou mediante a intervenção

terapêutica específica (Marsden *et al.*, 1984a, Carvalho *et al.*, 1995, Oliveira-Neto *et al.*, 1998, Gontijo & de Carvalho, 2003).

Cerca de 3 a 5% de pacientes de LC causados por *Lb* desenvolvem a forma mucosa (Marsden, 1986), uma forma mais grave, caracterizada por lesões destrutivas na cavidade oral e nasofaríngea (Llanos Cuentas *et al.*, 1984, Amato *et al.*, 2008). Há evidências de que a metástase do parasito para este sítio possa ocorrer precocemente, ainda durante o evento primário (Pessoa & Barreto 1948). Em geral as lesões de LM são mais resistentes ao tratamento, exigindo doses maiores de drogas e recidivando com mais frequência que a forma cutânea (Zajtchuk *et al.*, 1989, Reithinger *et al.*, 2007, Amato *et al.*, 2009).

Tratamento da leishmaniose tegumentar Americana causada por L. braziliensis

Apesar da LC ser uma doença com evolução benigna, o tratamento medicamentoso para a LTA torna-se indispensável, uma vez que não existem medidas de controle mais eficazes para prevenção da doença.

O tratamento para a LTA que é preconizado pelo Ministério da Saúde (MS) é baseado primariamente na administração do antimonial pentavalente N-metilglucamina (Glucantime[®] – Rhodia, SP, Brasil) via intramuscular ou intravenosa. Como opções terapêuticas de segunda linha são disponibilizadas nos serviços de saúde o isotionato de pentamidina e a anfotericina B.

Para o tratamento da LC recomenda-se a administração de 10-20mg/kg/dia do antimonial pentavalente durante 20 dias, e em casos de LM, 20mg/kg/dia durante o período de 30 dias. Se após 60 dias de acompanhamento clínico, ainda houver persistência da lesão, o que se caracteriza como falha terapêutica na região da Grande Manaus, uma nova série do tratamento pode ser repetida. Os índices de cura com os antimoniais na LTA são difíceis de serem avaliados, visto que ainda faltam estudos controlados utilizando diferentes posologias das drogas empregadas. É provável que as espécies de *Leishmania* tenham influência na resposta terapêutica aos antimoniais devido a diferenças na susceptibilidade das mesmas às drogas leishmanicidas (Arevalo *et al.*, 2007).

O tratamento com antimonial apesar de se mostrar eficaz na maioria dos casos, apresenta algumas desvantagens. A necessidade de várias aplicações por um longo período de tempo, somada a uma alta toxicidade que resulta em efeitos adversos como artralgia, mialgia, náuseas, alterações renais e cardíacas, dentre outros, (MS, 2010) são responsáveis pela baixa aderência do paciente a terapia ou até mesmo ao abandono. Em função disto têm sido propostos esquemas alternativos de tratamento. Desde a década de 90 já foi evidenciado que o tratamento com baixas doses de antimônio (Oliveira-Neto *et al.*, 1996, 1997) ou a terapia intralesional (Oliveira-Neto *et al.* 1997, Vasconcellos *et al.* 2012) podem ser eficazes e levar a cura clínica da doença, até mesmo em relação as formas clínicas mais difíceis de serem tratadas.

Os regimes terapêuticos alternativos, como baixa dose de antimônio, não fazem parte das orientações do MS, em parte devido à escassez de estudos que certifiquem a eficiência destas doses após longo tempo pós-tratamento. Recentemente, Vieira-Gonçalves e colaboradores (2015) avaliaram pacientes de LC provenientes do Estado do Rio de Janeiro que foram tratados com doses baixas de antimônio, e observaram que mesmo o tratamento tendo sido realizado há mais de 10 anos, os mesmos permaneciam curados sem surgimento de recidivas ou acometimento secundário de mucosas.

Em função dos achados encontrados no estudo acima, juntamente com outras evidências já descritas na literatura (Oliveira-Neto *et al.*, 1996, 1997), o novo Manual de Leishmaniose apresentará uma nota recomendando a dose baixa para situações específicas. Sendo assim, o desenvolvimento de estudos que ratifique a ideia de que o tratamento com doses baixas pode ser eficaz e seguro será relevante para o estabelecimento deste regime terapêutico na prática clínica.

Definição de cura na Leishmaniose tegumentar Americana

O critério de cura na LTA ainda é apenas clínico. Na forma cutânea, o paciente é considerado curado quando ocorre a reepitelização das lesões ulceradas ou não ulceradas e regressão total da infiltração e eritema até três meses após a conclusão do esquema terapêutico. Este processo pode ser caracterizado pela persistência do parasito mesmo após a cicatrização da lesão (Schubach *et al.*, 1998, 1998, Mendonça *et al.*, 2004).

Resposta imune: patogênese x cura na Leishmaniose tegumentar Americana

O equilíbrio entre a resposta imunológica do hospedeiro e a capacidade de evasão do parasito, sua virulência/adaptação ao meio pode determinar o tipo de evolução e a gravidade da infecção. Levando-se em conta o que foi citado nos tópicos anteriores deste capítulo, é de conhecimento geral que uma grande parte dos indivíduos pode ser exposto ao parasito e adquirir a infecção, sem desenvolver a doença (Souza *et al.*, 1992). Este fenômeno pode ser, em parte, explicado pela manutenção de uma imunidade duradoura, indicando que o frequente estímulo parasitário pode conferir proteção contra reinfecções ou reativação da leishmaniose (Follador *et al.*, 2002, Bittar *et al.*, 2007). Entretanto, apesar de ter ficado claro que a resposta imunológica pode ser um fator essencial para o desfecho clínico da leishmaniose, ainda surgem alguns questionamentos relevantes: o que leva alguns indivíduos desenvolverem a doença e outros não? O que leva alguns pacientes curarem espontaneamente e outros necessitarem do tratamento para obterem a cura? O que leva indivíduos manterem a cura e outros evoluírem para um prognóstico desfavorável, com o aparecimento de recidivas ou o desenvolvimento de formas mucosas? Infelizmente, até o momento ainda não se sabe com precisão as respostas para estas indagações. No entanto, existem fatores que podem influenciar a dicotomia entre patogênese e a cura.

No modelo experimental de infecção por *L. major*, é amplamente aceito que a susceptibilidade de camundongos BALB/c a *Leishmania* está associada com a produção de IL-4 e IL-10 (Locksley *et al.*, 1991, Scott *et al.*, 1991), enquanto que a resistência da linhagem C57BL/6 a este parasito está intimamente relacionada a produção de citocinas como IFN- γ , IL-12 e TNF. Dessa forma, a dicotomia Th1 x Th2 observada nesse modelo está associada à produção de IL-4 em camundongos susceptíveis e de IFN- γ em camundongos resistentes, no que concerne à infecção por *L. major* (Heinzel *et al.*, 1989). No entanto, essa relação Th1 x Th2 não é observada em casos humanos e em alguns modelos de leishmaniose visceral (Melby *et al.*, 2001).

É de conhecimento que na doença humana da LTA, a diversidade de formas clínicas se sobrepõe a um perfil de resposta imunológica que pode contribuir para a patogenia ou para a cura. Citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β contribuem para a replicação do parasito e estabelecimento da infecção, embora IL-10 e TGF- β também participem da modulação de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF. Contudo,

estudos mais recentes têm observado que a evolução para a cura não depende do domínio de apenas um dos perfis de resposta; ao contrário um balanço entre eles juntamente com a ação de mecanismos imunomodulatórios se faz necessário para se alcançar o equilíbrio na relação parasito-hospedeiro e conseqüentemente a cura da doença (Gomes-Silva *et al.*, 2007).

O padrão de citocinas expresso nas lesões ou sintetizados *in vitro* por células mononucleares do sangue periférico (CMSP – em inglês PBMC) em resposta aos antígenos de *Lb* evidencia um perfil misto de produção de citocinas pro- e anti-inflamatória/regulatórias durante a doença ativa (Pirmez *et al.*, 1993, Bacellar *et al.*, 2002, Amato *et al.*, 2003). Contudo, este padrão não é observado nos pacientes de LM, pois os mesmos apresentam uma produção elevada de citocinas inflamatórias, como IFN- γ e TNF (Da-Cruz *et al.*, 1996, Bacellar *et al.*, 2002), em detrimento da produção de IL-10 que é reduzida nesta manifestação clínica (Bacellar *et al.*, 2002, Faria *et al.*, 2005).

As células T CD4 são as principais produtoras de IFN- γ (Santos *et al.*, 2013), e esta citocina, juntamente com TNF são capazes de ativar macrófagos e controlar a proliferação do parasito nas fases iniciais da infecção por *Leishmania*. Contudo, uma forte resposta inflamatória conduzida por essas células pode contribuir para a patogênese da doença, podendo colaborar para a destruição tecidual (Bacellar *et al.*, 2002). Apesar do papel das células T CD4 serem bem definido, a função dos linfócitos T CD8 na infecção por *Lb* ainda é muito controverso. Alguns autores argumentam que estas células participam do estabelecimento e progressão da doença, principalmente através de mecanismos citotóxicos que podem promover a injúria do tecido (Barral-Netto *et al.*, 1995, Brodskyn *et al.*, 1997, Santos *et al.*, 2013). Outros, porém afirmam que estes linfócitos podem estar envolvidos no processo de cura da leishmaniose (Da-Cruz *et al.*, 1994, Coutinho *et al.*, 1996, Da-Cruz *et al.*, 2002, Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012), particularmente através de uma atividade moduladora sobre linfócitos T CD4 (Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012), indicando que o equilíbrio entre essas células configura uma etapa importante para o desenvolvimento da cicatrização da lesão. O entendimento da imunopatogenia desencadeada por células T CD4 e T CD8 é essencial para o desenvolvimento de vacinas e de novas estratégias terapêuticas na leishmaniose tegumentar em humanos.

Atualmente tem sido observado que além de T CD4 e T CD8, outros linfócitos T podem participar da resposta imunológica desencadeada na leishmaniose tegumentar. Muito se discute a importância de células Th17, produtoras de IL-17, na autoimunidade e em doenças inflamatórias crônicas (Moseley *et al.*, 2003, Hashimoto *et al.*, 2005). Na leishmaniose, os poucos estudos sobre esta molécula, geralmente a associam com o aumento do infiltrado inflamatório (Bacellar *et al.*, 2009) nas lesões de pacientes de LC e LM. Além disso, a IL-17 induz o recrutamento de neutrófilos e a produção de mediadores como IL-1, IL-6 e TNF nos casos de LM, indicando que este mediador pode cooperar para o agravamento desta apresentação clínica (Boaventura *et al.*, 2010). Apesar dessas descobertas em relação ao papel desta citocina na doença ativa, ainda não sabe ao certo sobre a função desta molécula após a cura.

De fato, é indiscutível que haja um avanço no conhecimento sobre a resposta imune desenvolvida durante a fase ativa da LTA. Todavia, pouco se sabe sobre o perfil imunológico estabelecido após a cura, visto que a maioria dos trabalhos em leishmaniose não enfatiza esta fase clínica da doença.

Ao se examinarem alguns estudos verificou-se que há uma associação entre a evolução para a cura e a manutenção dos níveis de produção de IFN- γ , tanto em pacientes com LC (Da-Cruz *et al.*, 2002, Castellano *et al.*, 2009), como em pacientes de LM (Da-Cruz *et al.*, 2002). Entretanto, apesar da resposta imune do tipo Th1 ser crucial para o controle da leishmaniose tegumentar, a perda da modulação apropriada pode ser responsável pela patologia da doença. Indivíduos com um bom prognóstico da doença (assintomáticos, cura espontânea e pacientes curados de LC), apresentam uma maior capacidade de produzir IL-10 do que os pacientes curados de LM (Gomes-Silva *et al.*, 2007, Bittar *et al.*, 2007). Em consequência disso, nota-se ainda nestes casos uma relação equilibrada entre as citocinas IFN- γ e IL-10, o que não é observado nos pacientes da forma mucosa (Gomes-Silva *et al.*, 2007), provavelmente devido a sua dificuldade de modular a reação inflamatória exacerbada. Sendo assim, a IL-10, juntamente com outras citocinas como TGF- β e IL-27 parece desempenhar um papel importante na manutenção da imunidade do hospedeiro (Belkaid *et al.*, 2001, Yoshimura *et al.*, 2006).

A resposta imune também pode ser regulada pela presença de células T reguladoras (Treg) no ambiente. Elas compõem 2-5% das células T CD4 em humanos e

são desenvolvidas continuamente como uma linhagem comum do timo, constituindo uma subpopulação distinta de outras células T ou timócitos (Itoh *et al.*, 1999). São descritos dois grupos de células Treg que diferem entre si em termo de especificidade e mecanismos de ação: *i*) as Treg naturais, que se desenvolvem e emergem do timo com função reguladora, e atuam na periferia modulando possíveis reações auto-imune potencialmente patológicas, e *ii*) as Treg (Treg do tipo 1, - Tr1, Th3 e outras) que se desenvolvem como consequência da ativação de linfócitos T maduros, em condições específicas de exposição antigênica e sob influencia de diferentes citocinas, principalmente IL-10 e TGF- β .

Os mecanismos reguladores das células Treg incluem a supressão por contato célula a célula mediado pelo receptor inibitório CTLA-4, o consumo excessivo de IL-2 pela própria célula Treg e a secreção de citocinas regulatórias (TGF- β e IL-10), que em conjunto levam a diminuição da resposta de células T. Sua atividade *in vivo* parece estar mais relacionada com a presença de citocinas como IL-10 e TGF- β (Read *et al.*, 2000, O'Garra *et al.*, 2004). O principal marcador específico desta linhagem é o fator transcricional *foxp3*, do qual mantêm as funções reguladoras destas células (Beissert *et al.*, 2006).

Evidências demonstram que em lesões causadas por *Lb* ocorra um acúmulo de células Foxp3+ e uma supressão da proliferação e da produção de citocinas por células T efectoras (Campanelli *et al.*, 2006). Carneiro e colaboradores (2009) observaram ainda que a porcentagem de células Treg é mais elevada em pacientes de leishmaniose cutânea difusa (LCD) do que nos casos de LC e LM, sugerindo que estas células poderiam estar modulando para baixo a resposta efectora nestes indivíduos. Também já foi notada uma correlação positiva entre as células Foxp3+ encontradas nos casos de LC e LM e células apoptóticas, sugerindo que nessas formas clínicas a apoptose pode ser um mecanismo de ação das células Treg (Carneiro *et al.*, 2009). Por último, estudos mais recentes têm evidenciado que as células Treg de pacientes com LC apresentam um nível mais elevado de produção da IL-10 do que em indivíduos com infecção subclínica da doença (Costa *et al.*, 2013).

De forma geral, comenta-se com frequência sobre o papel das células T na patogênese e proteção das diferentes formas clínicas da LTA. Entretanto, embora o linfócito T predomine nas lesões de leishmaniose, desde os anos 1980 já se sabe que os

plasmócitos também estão presentes no infiltrado da lesão (Magalhães *et al.*, 1986b). Surpreendentemente, mais de 20 anos se passaram, e o papel destas células e de seus produtos na imunopatogênese da LTA ainda é desconhecido. Discute-se a possibilidade das mesmas terem funções adicionais que vão além da capacidade de produzir anticorpos utilizados para o diagnóstico sorológico da doença.

Resposta imune mediada por anticorpos na leishmaniose tegumentar Americana

Estudos demonstraram que as imunoglobulinas (Ig) anti-*Leishmania* podem participar de mecanismos de evasão deste parasito, e que estes podem ter sua sobrevivência favorecida por meio da opsonização (Pleass & Woof 2001, Miles *et al.*, 2005, Buxbaun, 2008). Além disso, verificou-se a importância da fagocitose de parasitos opsonizados por anticorpos quanto ao direcionamento da via de apresentação de antígenos para linfócitos T. Dada a importância de linfócitos T CD8 no controle da infecção por *Leishmania*, foi demonstrado que animais deficientes em Fc γ exibem falha em apresentar antígenos via MHC de classe I (den Haan *et al.*, 2002)

O padrão de produção de Ig anti-*Leishmania* na LTA nem sempre tem sido observado, visto que sua utilização nos ensaios tem se restringido ao diagnóstico da leishmaniose. De fato, existem poucos trabalhos na literatura que avaliaram o perfil de síntese de Ig antes e após o tratamento (Brito *et al.*, 2001, Castellano *et al.*, 2009, Fagundes-Silva *et al.*, 2012). Resultados do nosso grupo mostraram que a cura clínica da LC está associada com a redução dos níveis das subclasses IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* (Fagundes-Silva *et al.*, 2012). Neste trabalho, foi observado que após dois anos de cura, os níveis de IgG1 e IgG3 tendem a se tornar semelhante aos de indivíduos sem nenhum histórico da doença. Estes dados são consistentes com a ideia de que o processo de cicatrização da lesão traz consigo um balanço entre a relação parasito-hospedeiro, levando a uma diminuição dos antígenos de *Leishmania*, e consequentemente uma redução da resposta imune efetora. Dessa forma, a detecção sérica de IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* surge como uma possível ferramenta imunológica que pode ajudar na decisão de interrupção do acompanhamento clínico dos pacientes de LC. Assim, a manutenção de níveis elevados de anticorpos pode ser uma maneira de prever a reativação ou a evolução da doença para formas mais graves, uma vez que, após a cura clínica, os níveis desses mediadores tendem a cair gradativamente.

Isto pode explicar porque pacientes com LM apresentam níveis mais elevados de Ig quando comparado com os casos de LC (Junqueira *et al.*, 2003).

Apesar dos avanços na pesquisa sobre leishmaniose, ainda não estão disponíveis medidas eficazes de controle da doença. Considerando a dificuldade em prever o prognóstico dos pacientes de LTA, a avaliação de parâmetros imunológicos pode ser uma estratégia importante para o monitoramento clínico desses pacientes após o tratamento. Nesse contexto, apesar de escassos, os estudos sobre a resposta de anticorpos anti-*Leishmania* tem contribuído para o preenchimento desta lacuna de conhecimento. Estudos posteriores precisam ser realizados a fim de avaliar o perfil desses mediadores após longo tempo de cura, para que futuramente a análise dessas imunoglobulinas possa ser utilizada na prática clínica da leishmaniose.

Memória imunológica na leishmaniose tegumentar

De fato, apenas 5,2% dos indivíduos curados de LC irão desenvolver uma nova lesão no futuro (Jirmanus *et al.*, 2012), indicando que na leishmaniose tegumentar a maioria dos indivíduos adquirem uma imunidade duradoura após a cicatrização da lesão.

A ativação de linfócitos T específicos aos antígenos de *Leishmania* resulta na geração e persistência de células T de memória, que supostamente confere proteção contra possíveis reativações ou reinfecções ao longo de toda vida. De particular interesse, as células T de memória e *naive* apresentam diferenças entre si quanto à expressão do antígeno leucocitário comum CD45. O CD45 é uma tirosina fosfatase envolvida na transmissão de sinais entre células T e B (revisado por Trowbridge e Thomas, 1994). Diferentes isoformas deste antígeno são expressas na superfície de linfócitos T durante o processo de diferenciação celular. A isoforma CD45RA é típica de linfócitos T *naive* e a isoforma CD45RO está associado com linfócitos T de memória em humanos (Smith *et al.*, 1986, Sanders *et al.*, 1988). Além do CD45, duas outras moléculas de superfície também são capazes de distinguir linfócitos T *naive* de linfócitos T de memória: o CD62L e o CCR7. O CD62L é uma selectina responsável pela interação dos linfócitos e outros leucócitos com o endotélio das vênulas endoteliais altas. Já o receptor de quimiocina CCR7 controla a migração para órgãos linfóides

secundário. Todos os linfócitos T *naive* apresentam altos níveis destas moléculas em sua superfície, enquanto alguns linfócitos T de memória perdem a expressão do CD62L e/ou CCR7 (Sallusto *et al.*, 1999). Dessa forma, as células T de memória podem ser classificadas como: linfócitos T de memória efetora (TME) ou memória central (TMC), de acordo com suas características fenotípicas e funcionais (Esser *et al.*, 2003). Geginat e colaboradores (2003) identificaram ainda uma terceira população de linfócitos T CD8 de memória efetora. Diferente das outras células de memória, esta subpopulação possui alta expressão de CD45RA e são caracterizadas por serem células de memória altamente diferenciadas – TEMRA.

Sob nova exposição antigênica através de células apresentadoras de antígenos (APC), a TMC irá realizar uma série de funções como: gerar clones de células T antígeno-específico com capacidade efetora, auxiliar o aumento de atividade de APC em apresentar antígenos para um maior repertório de linfócitos T antígeno-específico, proliferarem após novo estímulo, e induzir a diferenciação de células com função regulatória via secreção de IL-10. Além disso, são consideradas células de longa duração, não necessitando de novas exposições ao antígeno para garantir sua sobrevivência por longo tempo. Já os linfócitos TME (CD45RA-CCR7-) são células em que há ausência dos receptores CCR7, encontrando-se normalmente nos tecidos periféricos. Sob novo estímulo antigênico específico, elas rapidamente respondem com a geração de células efetoras. Sua imediata resposta pode contribuir para o controle de novas infecções. No entanto, as TME requerem a continuada estimulação com antígeno específico para sua manutenção (Esser *et al.*, 2003, Sallusto *et al.*, 2004, Scott, 2005).

Uma das grandes lacunas de conhecimento que precisa ser preenchida sobre a resposta imunológica contra patógenos é o papel da persistência parasitária na geração de células T de memória. Evidências tem sugerido que a imunidade não é mantida na ausência de patógenos após a cura da enfermidade (Zinkernagel, 2003). Por outro lado, existem trabalhos utilizando modelo experimental que tem demonstrado que a imunidade e a memória podem ser induzidas, independente da estimulação antigênica (Beverly, 2006).

Na leishmaniose, os poucos estudos descritos utilizando modelo experimental demonstraram que na infecção de camundongos C57BL/6 com uma cepa transgênica de *L. major*, no qual infecta o camundongo, mas não sobrevive por um longo tempo nele,

apenas células TMC CD4 foram encontradas. Sob uma nova estimulação antigênica, linfócitos TMC se tornaram células efetoras e migraram para o tecido para mediar à proteção. Dessa forma, a imunidade a *L. major* nesse estudo foi mediada por duas populações de células T CD4 distintas: células efetoras que dependem da presença do patógeno, mas que sobrevivem por um curto período e células TMC que independem da presença do parasita e sobrevivem por um longo período (Zaph *et al.*, 2004).

Ainda são desconhecidos os mecanismos envolvidos na geração e manutenção dessas células de memória em humanos, fundamentalmente na infecção por *Lb*. A identificação de marcadores associados à memória e a proteção continua sendo um dos grandes desafios no desenvolvimento de vacinas para a leishmaniose humana. Até o momento sabe-se que para a formação de células TMC faz-se necessária a atuação de mecanismos regulatórios, como a participação de moléculas como CTLA-4, que resulta na diminuição dos níveis de ativação da resposta celular específica (Zaph *et al.*, 2004, Gollob *et al.*, 2005, Gollob *et al.*, 2008). Dessa forma, uma redução gradativa da intensidade de resposta imune a *Leishmania*, de forma dependente do tempo de cura, pode estar contribuindo para que estes indivíduos desenvolvam células TMC, embora a persistência parasitária seja um fato já comprovado (Schubach *et al.*, 1998). Apesar desta hipótese, os poucos estudos em LTA tem demonstrado que após a cura há um maior desenvolvimento do compartimento de células TME, em detrimento do compartimento de células TMC.

Já foi demonstrado que após um segundo estímulo antigênico, as células TME podem desempenhar um papel importante no controle da infecção por *Lb*, principalmente através da produção de IFN- γ (Carvalho *et al.*, 2013, Keshavarz *et al.*, 2013). Corroborando com estes achados, dados do nosso grupo também mostraram que em indivíduos curados de LC ocorre uma expansão de células TME em resposta ao estímulo de *Lb* (Pereira-Carvalho *et al.*, 2013). Assim, esses estudos sugerem que as células TME parecem contribuir significativamente para a resposta protetora na LTA e, conhecendo a natureza desse perfil fenotípico, é bastante provável que a ocorrência de estímulos antigênicos esteja favorecendo para a perpetuação das mesmas. Estes estímulos podem estar ocorrendo devido ao fato destes pacientes permanecerem em áreas de transmissão do parasito ou pela possibilidade da persistência parasitária, mesmo longo tempo depois de estabelecida à cura clínica. Apesar de não ter sido observado relação do período de longo tempo após a cura com as células TMC,

acredita-se que estas células também desempenhem um papel importante na manutenção da cura dos pacientes de LTA. Estudos posteriores precisam ser realizados a fim de melhor compreender o papel da memória na infecção pela *Leishmania*, e utilizar esse conhecimento na geração de possíveis candidatos vacinais para leishmaniose.

OBJETIVOS

Geral

Investigar a capacidade de manutenção da resposta imune induzida pela infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* nos indivíduos curados de leishmaniose cutânea longo tempo após tratamento com dois diferentes esquemas terapêuticos com antimônio.

Específicos

- a) Avaliar fenotipicamente se os compartimentos de linfócitos T de memória central e efetora apresentam alterações numéricas ou funcionais após longo tempo de cura clínica da LC.
- b) Avaliar a dinâmica da produção das subclasses de IgG em diferentes tempos após a cicatrização das lesões de LC, com o intuito de verificar se os pacientes curados mantêm níveis séricos de imunoglobulinas anti-*Leishmania* detectáveis mesmo longo tempo pós-terapia.
- c) Investigar o grau de interação entre os parâmetros imunológicos de indivíduos com longo tempo após a cura clínica da LC e determinar a possível bioassinatura imunológica associada com o perfil de cura clínica estável.

MATERIAL E MÉTODOS

Artigo 1 (Publicado)

Título: Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous *Leishmaniasis* lesion healing is correlated with the time of clinical cure.

Autores: Fagundes-Silva, GA¹, Vieira-Gonçalves, R¹, Nepomuceno, MP², de Souza, MA³, Favoreto S, Jr⁴, Oliveira-Neto, MP⁵, Da-Cruz, AM¹, Gomes-Silva, A^{1*}.

¹Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil,

²Universidade Estácio de Sá, Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro, Brazil,

³Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil,

⁴Allergy and Immunology Division, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL, USA,

⁵Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

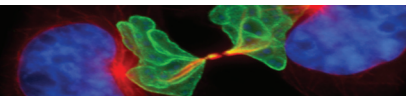
*Corresponding author: Adriano Gomes-Silva, Av. Brasil 4365, Pavilhão Leônidas Deane 17 4º. andar, Mangueiras, Rio de Janeiro – RJ, Brazil. CEP: 2140-900. Telephone number: 18 00.55.21.3865-8174. Fax number: 00.55.21.2290-0479

Keywords: clinical cure, cutaneous leishmaniasis, ELISA, IgG1, IgG3, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, low dose antimony, therapeutic efficacy

Parasite Immunology 2012; 34: 486-491.

RESUMO

Para uma melhor eficiência no estabelecimento da cura clínica na leishmaniose tegumentar Americana, a Organização Mundial de Saúde sugere que os critérios clínicos sejam fundamentados em dados sorológicos. O presente estudo teve como objetivo investigar a dinâmica da produção de subclasses de imunoglobulina G (IgG) na evolução pós-tratamento da leishmaniose cutânea (LC). Amostras de soros pareadas obtidas de 23 indivíduos com LC resultante da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram avaliados durante a fase de lesão ativa (aCL) e após a cura clínica da doença (hCL), que incluiu um protocolo alternativo com uma dose baixa de antimônio. A IgG anti-*Leishmania* e suas subclasses foram quantificadas pela técnica de ELISA, e os níveis de imunoglobulina foram correlacionados com dados clínicos dos pacientes. Todos os indivíduos permaneceram curados e não apresentaram recidiva durante o acompanhamento clínico. Os níveis séricos de IgG anti-*Leishmania* ($r = -0,79$; $p < 0,0001$), IgG1 ($r = -0,64$; $p < 0,001$) e IgG3 ($r = -0,42$; $p < 0,045$) dos hCL foram correlacionados negativamente com a duração da cura clínica. Após 24 meses de cura clínica, 73% das amostras foram negativas para a IgG1 e 78% foram negativos para IgG3. Em conclusão, a detecção IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* no soro pode ser uma importante estratégia laboratorial para ajudar na decisão de interrupção do acompanhamento ambulatorial dos pacientes com LC após o tratamento.



Brief Definitive Report

Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cureG. A. FAGUNDES-SILVA,¹ R. VIEIRA-GONCALVES,¹ M. P. NEPOMUCENO,² M. A. DE SOUZA,³ S. FAVORETO JR,⁴ M. P. OLIVEIRA-NETO,⁵ A. M. DA-CRUZ¹ & A. GOMES-SILVA¹

¹Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, ²Universidade Estácio de Sá, Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro, Brazil, ³Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil, ⁴Allergy and Immunology Division, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL, USA, ⁵Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

SUMMARY

For better efficiency in the establishment of American tegumentary leishmaniasis clinical cure, the World Health Organization suggests that the clinical criteria are supported by serologic data. The present study aims to investigate the dynamics of IgG subclass production in clinical evolution post-treatment of cutaneous leishmaniasis (CL). Paired sera from 23 subjects with CL resulting from *Leishmania braziliensis* infection were studied during the active lesion phase (aCL) and after clinical cure post-therapy (hCL), which included an alternative protocol with a low dose of anti-mony. Anti-*Leishmania* IgG and its subclasses were measured using ELISA, and the immunoglobulin levels were correlated with patients' clinical data. All of the subjects were clinically healed and did not present relapse during follow-up. Serum levels of anti-*Leishmania* IgG ($r = -0.79$; $P < 0.0001$), IgG1 ($r = -0.64$, $P < 0.001$) and IgG3 ($r = -0.42$, $P < 0.045$) in hCL were negatively correlated with the duration of clinical cure. After 24 months of clinical cure, 73% of samples were negative for IgG1 and 78% were negative for IgG3. In conclusion, the detection of serum anti-*Leishmania* IgG1 and IgG3 is an improved laboratory strategy to aid in the decision of interruption of the ambulatory follow-up of CL patients.

Keywords clinical cure, cutaneous leishmaniasis, ELISA, IgG1, IgG3, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, low dose antimony, therapeutic efficacy

INTRODUCTION

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is one of the priority diseases of the World Health Organization (WHO) (1). There is no effective strategy to prevent ATL, and patient treatment is a key intervention of disease control. A certification of ATL remission is nearly always based on clinical characteristics, predominately on the visual aspect of scars. Despite apparent visual healing, parasites can persist for up to several years after healing of the lesion (2,3), and inflammatory sites can be observed by histological analyses (4). Therefore, the remission of lesions after treatment is not always permanent, and prognosis can be uncertain because patients can reactivate or even develop mucosal disease (5).

Considering the difficulty in predicting the prognosis of ATL patients (6), an evaluation of immunological parameters is important for the clinical monitoring of ATL post-therapy. Anti-*Leishmania* antibody levels may vary according to parasite load (7), the duration of infection (8), *Leishmania* species (9,10) and inherent host factors (7). Several authors have positively correlated the clinical cure of ATL with a decline in anti-*Leishmania* immunoglobulins (11–14). The WHO suggests that the clinical criteria of cure of ATL could be supported by serological methods (15). However, these methods are not yet currently used in clinical practice, which is partly due to the history of low efficiency in the detection of anti-*Leishmania* antibodies. This study aims to evaluate the dynamics of anti-*Leishmania*

Correspondence: Adriano Gomes-Silva, Av. Brasil 4365, Pavilhão Cardoso Fontes térreo, Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, CEP 21040-900, Brazil (e-mail: gomesas@ioc.fiocruz.br).

Disclosures: The authors have no conflict of interest to declare.

Received: 11 December 2011

Accepted for publication: 14 June 2012

IgG subclass production at different times after the healing of CL lesions.

MATERIALS AND METHODS

Characterization of patients

Twenty-three subjects with an established diagnosis of CL were followed-up after discharge from a health unit from Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FIOCRUZ. The group was composed of 16 men (mean age, 36.4 years; age range, 18–55 years) and seven women (mean age, 34.4 years; age range, 15–58 years). All of the patients were from Rio de Janeiro State, Southeast of Brazil, which has endemic areas for *Leishmania braziliensis*. Most of the patients (74%) lived near or inside the forest. Sera were collected during active CL (aCL; duration of illness = 66.8 ± 36.1 days; median, 60 days) and after the clinical healing of CL (hCL; duration of healing = 36 ± 14 months; median, 36 months). All of the subjects fulfilled the clinical, epidemiological, parasitological and immunological diagnostic criteria for ATL (16).

Patients were treated with pentavalent antimony. Twenty cases used low doses (<10 mg/kg/day), as described by Oliveira-Neto and colleagues (5). In this group, 17 patients were cured, and three other cases needed one complementary course of antimonial (10–20 mg/kg/day) before clinical cure was achieved. Three patients received one course of antimonial treatment (10–20 mg/kg/day) for 20 days as the first therapeutic intervention and were also cured. Regardless of the therapeutic regimen, all of the patients showed lesion healing, which persisted without recurrence until the last examination.

Patients were characterized by anthropometrical, clinical and laboratorial aspects, as described in Table 1. Twenty-one healthy subjects (HS; mean age, 30.5 years; age range, 22–45 years) were selected by the following criteria: no scars suggestive of CL, no history of family or 'neighbours leishmaniasis' cases and negative *in vitro* cellular immune response against *L. braziliensis* antigens.

ELISA for detection of anti-leishmanial immunoglobulins

The immunoassay protocol was performed as previously described (17). Briefly, *L. braziliensis* promastigote (MHOM/BR/195/2903) soluble antigen (10 µg/well) was added to a polystyrene flat-bottom microtitre plate (Nunc-immuno Plate, Roskilde, Denmark) and incubated at 4°C overnight in a humidified chamber. After washing, diluted sera (1 : 40) were added and incubated at room temperature. After six washes, the plate was incubated with peroxidase-conjugated mouse monoclonal anti-human IgG

(catalog number 62-6620, Invitrogen, San Francisco, CA, USA) and monoclonal anti-human IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 (HP6070 clone, HP6014 clone, HP6047 clone and HP6023 clone, respectively – Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA). After another round of washes, the enzymatic reaction was developed, and colour evolution was stopped with a stop solution. The absorbance was measured with an EMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 492 nm and expressed as optical density (OD).

Statistical analysis

The cut-off values were determined using a receiver operating characteristic curve (ROC curve). Kruskal–Wallis and Spearman's test were used for comparison and correlation analysis, respectively, using GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Serum samples were collected during active disease and at different periods after clinical cure. The ELISA specificity for the detection of anti-*Leishmania* antibodies was 97.8%. IgG, IgG1 and IgG3 quantitation reached 100% sensitivity, while the sensitivity for IgG2 and IgG4 was below 70%.

Immunoglobulin levels found in aCL were not associated with clinical characteristics, such as duration of illness, the enlargement of draining lymph nodes, the number, size or anatomical location of lesions and Montenegro skin test indurations. Interestingly, patients living nearest to or within the forest ($n = 13$) had higher IgG and IgG1 levels than did patients from urban areas ($n = 4$) ($P < 0.05$).

All of the aCL patients had a positive OD for the tested Igs, and a significant decrease in these levels was observed for hCL (Figure 1a–c; $P < 0.0001$). However, four patients presented OD values that were maintained or even augmented when samples were tested for IgG (four patients), IgG1 (three patients) and IgG3 (one patient) (Figure 1a–c, respectively). These four patients were followed-up for <12 months. Similar Ig levels were detected independently of the therapeutic protocol used. At 24 months after healing, the percentage of hCL subjects presenting negative samples was 73% for IgG1 and 78% for IgG3, while only 37% were negative for total IgG (Figure 1d–f, respectively). OD values calculated for hCL were negatively correlated with the duration of clinical cure for IgG ($r = -0.67$; $P < 0.0004$), IgG1 ($r = -0.64$, $P < 0.001$) and IgG3 ($r = -0.42$; $P < 0.045$) (Figure 1d–f, respectively).

Table 1 Anthropometrical, clinical and laboratorial data from cutaneous leishmaniasis patients during active lesion and after heal

Patient number	Age	Number of lesions	Lesion area (cm ²) ^a	Location of lesions	Disease duration (days)	MST (mm)	Amastigote presence in lesion	Sb ⁺⁵ dose	Duration of clinical cure (months)	IgG (OD)		IgG1 (OD)		IgG3 (OD)	
										aCL	hCL	aCL	hCL	aCL	hCL
1	42	1	2.8	Upper limb	60	12	Pos	Ld	37	2.874	2.016	0.445	0.092	0.254	0.064
2	32	1	6.9	Lower limb	30	12	Pos	Ld	34	2.863	1.663	0.628	0.110	1.351	0.157
3	46	1	1.6	Upper limb	90	22	Neg	Ld	18	3.563	2.009	0.677	0.143	1.517	0.248
4	24	1	9.4	Upper limb	120	26	Neg	Ld	48	3.679	1.667	0.890	0.082	0.917	0.135
5	23	3	NR	Trunk	60	30	Neg	Ld	38	3.175	2.096	1.921	0.164	0.398	0.057
6	43	1	2.2	Neck	60	21	Neg	Ld	38	2.905	1.516	0.584	0.046	1.363	0.120
7	16	1	3.1	Lower limb	45	9	Pos	Ld	12	3.000	3.364	1.156	0.254	1.138	0.120
8	43	1	6.1	Lower limbs	60	12	Pos	Ld	45	3.436	1.216	0.517	0.017	0.348	0.138
9	24	2	NR	Lower limb	180	20	Pos	Ld	36	2.774	1.908	0.396	0.064	0.922	0.563
10	46	1	2.1	Face	60	24	Pos	Ld	30	2.198	1.822	0.162	0.056	0.448	0.241
11	20	1	NR	Lower limb	NI	16	Neg	Ld	52	3.120	1.467	1.502	0.070	1.750	0.099
12	46	3	29.4	Face, upper and lower limbs	90	27	Pos	Ld	11	2.491	3.380	0.404	0.258	1.107	0.400
13	34	1	7.0	Trunk	90	NR	Pos	Ld	3	2.048	2.995	0.200	0.627	1.214	1.383
14	55	2	0.2	NI	30	18	Pos	Ld	23	3.032	1.606	0.249	0.088	0.340	0.096
15	58	2	2.4	Face	60	15	Pos	Ld	24	3.491	1.583	0.605	0.058	0.891	0.062
16	38	1	0.2	Upper limb	90	25	Pos	Ld	51	3.352	0.797	0.311	0.010	1.205	0.182
17	55	6	0.2	NI	90	17	Pos	Ld	29	2.110	1.097	0.205	0.014	0.391	0.219
18	41	1	2.9	Upper limbs	15	NR	Pos	Ld + Cd	36	2.896	1.513	0.640	0.055	0.767	0.180
19	15	1	1.3	Face	30	7	Pos	Ld + Cd	38	3.098	2.475	1.108	0.201	1.355	0.391
20	28	1	3.9	Neck	60	NR	Neg	Ld + Cd	8	2.692	3.604	0.411	0.521	0.465	0.300
21	18	1	2.8	Lower limbs	60	19	Neg	Cd	48	2.655	0.581	0.552	0.049	0.498	0.137
22	35	2	NR	Lower limbs	30	23	Pos	Cd	42	2.933	1.586	0.493	0.052	0.792	0.103
23	41	>10	0.7	NI	60	4	Neg	Cd	20	3.858	3.130	1.804	1.334	0.679	0.219

MST, Montenegro skin teste during active disease; Sb⁺⁵, pentavalent antimonial; aCL, active cutaneous leishmaniasis; hCL, healed cutaneous leishmaniasis; NR, not realized; NI, not informed; Ld, Low Sb⁺⁵ dose; Cd, conventional Sb⁺⁵ dose; OD, optical density.

^aIn cases of more than one lesion the diameter of the largest one was considered.

DISCUSSION

Currently, serological techniques have increased the sensitivity and/or specificity of the diagnostic tests used for ATL, especially for CL (14,17,18). Earlier work has demonstrated that measurement of IgG subclasses by ELISA or flow cytometry leads to improved diagnosis of ATL (14,18,19). In this study, we have shown that the specificity and sensitivity of the immunoassay are improved by the use of soluble antigens derived by ultracentrifugation of *L. braziliensis* promastigotes. The measurement of anti-*Leishmania* IgG1 or IgG3 appears to be a good choice for following up treated CL patients. Although some authors have suggested that the use of species-specific antigens increases the sensitivity of immunoassays (17,20), others have found that the use of heterologous *Leishmania* antigens did not result in a reduction in efficacy (14).

A considerable decrease in anti-*Leishmania* Ig levels is generally observed after CL healing (11–14,21). In this study, only four patients maintained high Ig levels after therapy, and all of them experienced clinical cure in <12 months. These results are expected if a prolonged period after clinical cure is required for the host's specific immune system to achieve homeostatic equilibrium (2,22). These four patients will be monitored to confirm the reduction in anti-*Leishmania* IgG1 and IgG3 following clinical cure. These results indicate that anti-*Leishmania* IgG1 and IgG3 are not useful as early cure criteria for successful therapy, as proposed for visceral leishmaniasis (23). However, these IgG subclasses can constitute a valuable biomarker to assist the clinical cure criteria during the 2 years of CL follow-up.

The majority of patients after two or more years of clinical cure had anti-*Leishmania* IgG1 and IgG3 levels similar to those observed in individuals with no history of

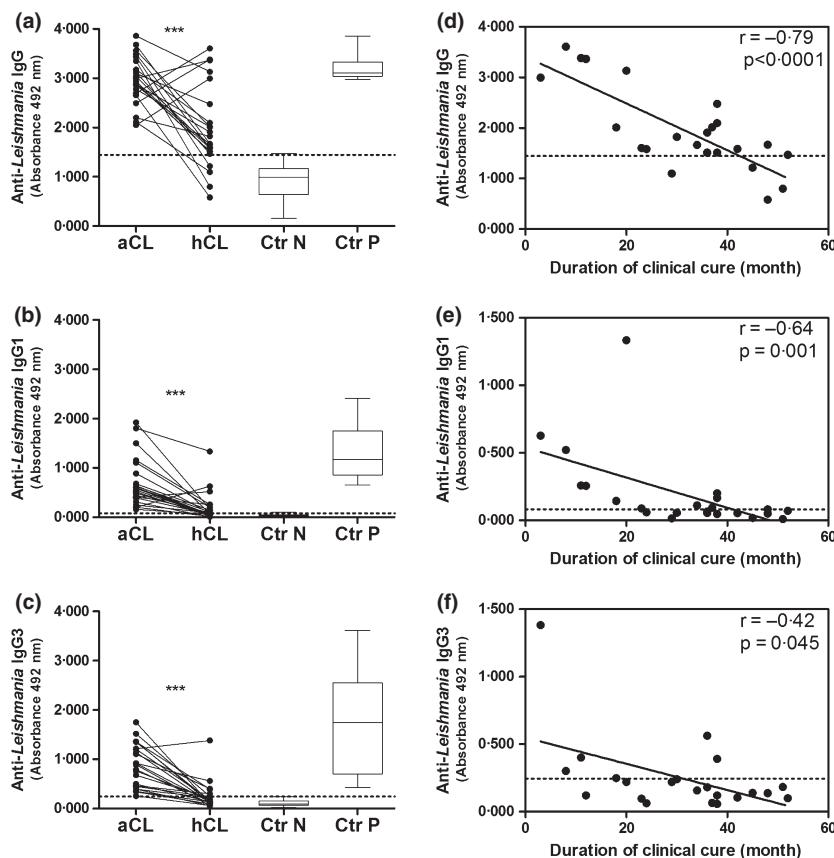


Figure 1 Reactivities of cutaneous leishmaniasis patient sera in ELISA. (a–c) Show the optical densities for paired serum samples during active cutaneous leishmaniasis (aCL) and after lesion healing (hCL) for anti-*Leishmania* IgG, IgG1 and IgG3, respectively. Three asterisks indicate $P < 0.001$. Box and whisker plots indicate the reactivities of the negative (Ctr N, $n = 21$) and positive controls (Ctr P, sera from aCL with high levels of total IgG and its subclasses, $n = 5$) for the ELISA reactions. The dotted line indicates the cut-off value. (d–f) Show the correlations between the absorbance and the duration of clinical cure in months for anti-*Leishmania* IgG, IgG1 and IgG3, respectively. The dotted line indicates the cut-off value. The straight slope represents the correlation curve. Each point represents one subject. r , correlation coefficient; P , statistical significance.

Leishmania infection. Because Ig levels may be correlated with parasitic burden (7), a conversion to negative Ig levels could indicate that our patients have controlled the *Leishmania* infection. In this study, we showed that anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 levels decreased in patients after therapy, even when low doses of antimony were used. A previous report comparing unpaired groups of patients showed that anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 levels were lower 1 year after healing than during active disease (21). Finally, it was curious to note that patients living nearest to or within the forest had augmented levels of IgG and IgG1, which could reflect a continuous exposure to sand fly bites.

In conclusion, the detection of serum anti-*Leishmania* IgG1 and IgG3 is an improved laboratory strategy for aiding the decision on interruption of the ambulatory follow-up of patients. Why anti-*Leishmania* IgG1 and IgG3 levels diminish faster than total IgG after clinical cure remains

unanswered. Subjects who present sustained or increased levels of serologic reactivity for paired samples should be monitored for periods longer than 2 years. These patients can maintain an elevated parasite burden, which in turn sustains immune system activation, conditions suggestive of a poor prognosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Mr. Nogueira RS for his help with the experimental procedures and for his intellectual contribution to our study. We are also grateful to Ms. Rosângela Pellegrino for secretarial assistance.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

The authors of this article contributed equally to this work. GAFS, MPN, RVG and AGS designed the study

protocol and analysed and interpreted the data. MPON, RVG and AMC performed the clinical assessment and follow-up of patients. AMC, MAS and SFJ contributed to drafting, writing and revising the manuscript. All of the authors read and approved the final manuscript. AGS and GAFS are guarantors of the paper.

FUNDING

This work was supported by a grant from Instituto Oswaldo Cruz – Internal funding, CNPq, FAPERJ. GAFS

REFERENCES

- WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 2010. WHO technical report series; no. 949.
- Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **58**: 824–827.
- Mendonça MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML & Abath FG. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 2004; **189**: 1018–1023.
- Morgado FN, Schubach A, Vasconcelos E, et al. Signs of an *in situ* inflammatory reaction in scars of human American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2010; **32**: 285–295.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC & Pirmez C. Treatment of American cutaneous leishmaniasis: a comparison between low dose (5mg/kg/day) and high dosage (20mg/kg/day) antimony regimens. *Pathol Biol* 1997; **45**: 496–499.
- Netto EM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, et al. Long-term follow-up of patients with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection and treated with Glucantime. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; **84**: 367–370.
- Gutierrez Y, Salinas GH, Palma G, Valderrama LB, Santrich CV & Saravia NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1991; **45**: 281–289.
- Trujillo C, Ramirez R, Vélez ID & Berberich C. The humoral immune response to the kinetoplast membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett* 1999; **70**: 203–209.
- Romero GA, Orge Orge MG, Guerra MVF, Paes MG, Macêdo VO & Carvalho EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop* 2005; **93**: 49–56.
- Matta NE, Nogueira RS, Franco AMR, et al. *Leishmania (Viannia) guyanensis* induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon Highland. *Am J Trop Med Hyg* 2009; **80**: 339–344.
- Delgado O, Guevara P, Silva S, Belfort E & Ramirez JL. Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* using conventional immunologic techniques and polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1996; **55**: 267–272.
- Amato VS, Duarte MI, Nicodemo AC, 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**: 23–30.
- Brito ME, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML & Abath FG. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; **95**: 203–206.
- Junqueira-Pedras M, Orsini M, Castro M, Passos VMA & Rabelo 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**: 477–485.
- WHO. Control of Leishmaniasis: report of a WHO Expert Committee, Geneva, 1990. WHO technical report series, no. 793.
- Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; **9**: 251–256.
- Gomes-Silva A, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, et al. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; **41**: 135–141.
- Pissinate JF, Gomes IT, Peruhype-Magalhães V, Dietze R, Martins-Filho OA & Lemos EM. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *J Immunol Methods* 2008; **336**: 193–202.
- Souza MA, da Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoretto SJ & Ferreira MS. Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in American tegumentary leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; **38**: 137–141.
- Barroso-Freitas AP, Passos SR, Mouta-Comfort E, et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; **103**: 383–389.
- Castellano LR, Filho DC, Argiro L, et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol* 2009; **70**: 383–390.
- Gomes-Silva A, Pereira-Carvalho R, Fagundes-Silva G, Oliveira-Neto MP & Da-Cruz AM. Homeostasis of specific immune response in clinically cured cutaneous leishmaniasis subjects due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; **42**: 147–150. Suplemento II.
- Gomes IT, Carvalho SF, Rocha RD, et al. Anti-*Leishmania chagasi* immunoglobulin G3 detected by flow cytometry for early cure assessment in American visceral leishmaniasis. *J Immunol Methods* 2010; **360**: 76–83.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Reactivities of cutaneous leishmaniasis patient sera in ELISA. A and B show the optical densities for paired serum samples during

active cutaneous leishmaniasis (aCL) and after lesion healing (hCL) for anti-*Leishmania* IgG2 and IgG4, respectively.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials

supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

APÊNDICES DE RESULTADOS

Introdução

A modulação da resposta efetora de células T é essencial na manutenção do processo de cura de inúmeras doenças infecciosas. Além disso, o desenvolvimento de vacinas contra agentes infecciosos que induzam uma resposta protetora de longa duração é objeto de grande interesse da saúde pública. Apesar do avanço da vacinologia, ainda há muito a se conhecer sobre os mecanismos envolvidos no estabelecimento da memória imunológica, particularmente em humanos.

Muitos grupos têm contribuído significativamente para o entendimento de fenômenos imunes que ocorrem durante a leishmaniose tegumentar ativa. Por outro lado, pouco tem sido estudado sobre mecanismos associados à resolução do processo infeccioso e a resposta imune duradoura após a cura. Estudos têm demonstrado que o estabelecimento da cura da LC induz mudanças no perfil fenotípico dos linfócitos T e na produção de citocinas da resposta imune (Da-Cruz *et al.*, 2002, Castellano *et al.*, 2009, Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012, de Assis *et al.*, 2013). Também já foi observado um padrão distinto de expressão de citocinas e fatores transcricionais após a cura. Dados do nosso grupo mostraram que pacientes curados de LC com tempo de cura clínico entre 2 e 5 anos apresentaram uma maior redução na expressão de citocinas e fatores transcricionais do que indivíduos que se curaram espontaneamente e pacientes curados há menos de dois anos pós-tratamento (Fagundes-Silva, em preparação). Neste sentido, também foi observado pelo mesmo grupo uma diminuição da ativação de células T CD4 e T CD8 com o aumento do tempo de cura clínica (Pereira-Carvalho *et al.*, 2013), indicando que provavelmente após a cura ocorra uma modulação para baixo da resposta imune.

É indiscutível que a ativação de linfócitos T específicos aos antígenos de *Leishmania* resulte na geração e persistência de uma imunidade duradoura, que tem como principal objetivo conferir proteção reativações ou reinfecções ao longo de toda vida. Os poucos estudos sobre a memória na leishmaniose humana observaram uma expansão do compartimento de células T de memória efetora (TME) frente aos antígenos de *Leishmania braziliensis* (*Lb*) após a cura (Carvalho *et al.*, 2013, Pereira-Carvalho *et al.*, 2013, Keshavarz *et al.*, 2013). Apesar destes trabalhos, ainda existe uma

grande lacuna de conhecimento sobre o papel da memória na infecção por *L. braziliensis*. O desenvolvimento de estudos nesta área pode trazer novas informações para o desenvolvimento de vacinas para a leishmaniose. Somado a isto, a maioria desses autores utilizou em seus estudos o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde. Alguns trabalhos já demonstraram que esquemas terapêuticos com doses baixas de antimônio podem levar ao mesmo êxito do que o tratamento convencional (Oliveira-Neto *et al.*, 1996, Oliveira-Neto *et al.*, 1997, Vasconcellos *et al.*, 2012, Vieira-Gonçalves *et al.*, 2015). Assim, o objetivo deste apêndice foi avaliar a capacidade de manutenção da resposta imune induzida por *L. braziliensis* em pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC) com longo tempo de cura que foram tratados com diferentes esquemas terapêuticos.

Material e métodos

Casuística

Dando seguimento aos estudos anteriores, pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC, n= 12) que foram tratados com uma baixa dose de antimônio (DB, 5 mg Sb⁵⁺/Kg/dia/30 dias, n= 06) ou com uma dose recomendada pelo MS – dose convencional (DC, 15 mg Sb⁵⁺/Kg/dia/30 dias, n = 06) e que já haviam completado o tratamento da leishmaniose por pelo menos doze anos (LCC 12-26anos) foram selecionados a partir de dois municípios do Estado do RJ: Paraty e Rio de Janeiro. Os pacientes foram recrutados por busca ativa nos locais de residência. No momento da visita, foram realizados exames clínico-dermatológicos, avaliação do aspecto clínico das cicatrizes de LC e registro fotográfico das mesmas. Os pacientes foram questionados sobre sintomas de LM, e foi realizado o exame da cavidade oral e nasal por rinoscopia anterior.

A média de idade dos pacientes LCC foi de $46,8 \pm 13,7$ anos. A maioria dos indivíduos apresentou apenas uma lesão durante a fase ativa. O tempo médio de cura clínica dos pacientes foi de $20,9 \pm 5,2$ anos. Não foi observado nenhum episódio de recidiva ou sinais sugestivos de lesão na mucosa de vias aéreas superiores.

Os voluntários sadios (grupo controle - CTR, n= 05) foram incluídos no estudo baseado nos seguintes critérios: ausência de lesão ou cicatriz sugestiva de LC, residência em regiões sem evidências de transmissão recente de *Leishmania* spp, e ausência de produção IFN- γ por células mononucleares estimuladas *in vitro* com antígenos totais de promastigotas *L. braziliensis* (*Lb*) (MHOM/BR/195/2903).

O desenho experimental de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)-FIOCRUZ/INI protocolo 007/2011, e está associado ao projeto "Avaliação da eficácia de baixas doses de antimonial pentavalente longo tempo após o tratamento de leishmaniose cutânea no Estado do Rio de Janeiro". Os indivíduos que concordaram em participar deste projeto assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, que foi redigido de acordo com as normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde.

Obtenção do material biológico

No momento de admissão do protocolo de estudo foi coletado um volume máximo de 30 mL de sangue periférico de cada indivíduo utilizando tubos contendo heparina. Alíquotas de soros e de plasma foram coletadas e estocadas a -20°C. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas a partir do sangue heparinizado através de centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA). Alíquotas destas células foram armazenadas em solução de criopreservação e acondicionadas em nitrogênio líquido para posterior utilização.

Avaliação do perfil fenotípico das células mononucleares do sangue periférico

As CMSP foram estimuladas *in vitro* com antígenos de *Lb* (MHOM/BR/195/2903) por 120 horas. Após o cultivo, As CMSP foram marcadas com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos: A) subpopulação linfocitária: CD3 (anti-CD3 humano APC-H7), CD4+ (anti-CD4 humano Percp), B) memória efetora (ME): CD4+ ou CD8+/CD45RA-CCR7- (anti-CD4 Percp, anti-CD45RA Alexa 700, anti-CCR7 PECF594, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA),

memória central (MC): CD4⁺ ou CD8⁺/CD45RA-CCR7⁺ (anti-CD4 Percp, anti-CD45RA Alexa 700, anti-CCR7 PECF594, BD Biosciences), C) ativação do compartimento de memória: CD4⁺ ou CD8⁺ (ME/MC)/CD38+HLA-DR⁺ (anti-CD4 Percp, anti-CD45RA Alexa 700, anti-CCR7 PECF594, anti-CD38 Pcy7, anti-HLA-DR V500, BD Biosciences), D) senescência: CD4⁺ ou CD8⁺ (ME/MC)/ CD57+CD27- (anti-CD4 Percp, anti-CD45RA Alexa 700, anti-CCR7 PECF594, anti-CD57 FITC, anti-CD27 V500) (Quadro1). As células foram adquiridas no citômetro da plataforma de citometria do IOC (FACSaria, EUA, Plataforma do IOC-Fiocruz) e os dados foram analisados utilizando o programa Kaluza 1.3 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). Para cada amostra foram adquiridos 50.000 eventos dentro da região definida para a população de linfócitos. A frequência de células positivas foi analisada na região definida de linfócitos (Figura 1). O limite de marcação dos quadrantes foi definido com base na população negativa e no controle de isotipos.

Quadro1: Fenótipo/Função de linfócitos T e seus marcadores

Fenótipo/Função	Moléculas utilizadas como marcadores
Ativação	CD3+CD4 ⁺ /CD3+CD8+CD38+HLA-DR ⁺
Memória efetora	CD3+CD4 ⁺ /CD3+CD8+CD45RA-CCR7-
Memória central	CD3+CD4 ⁺ /CD3+CD8+CD45RA-CCR7 ⁺
Senescência	CD3+CD4 ⁺ /CD3+CD8+CD27-CD57 ⁺

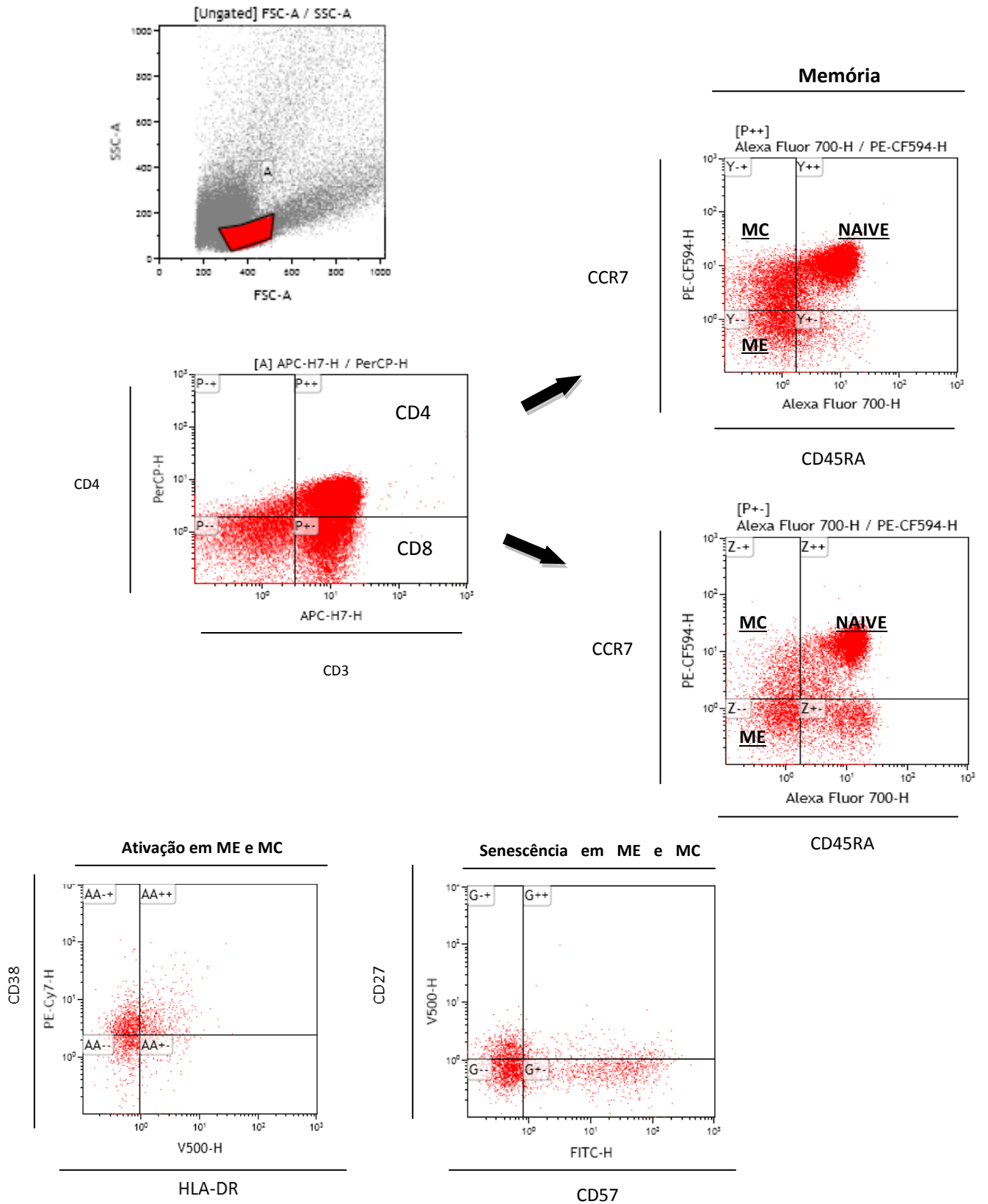


Figura 1: Análise representativa da citometria de fluxo realizada em células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígenos de *Leishmania braziliensis*.

Quantificação de imunoglobulina G e suas subclasses anti-Leishmania.

Os anticorpos IgG e suas subclasses (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) anti-*Leishmania* presentes no plasma dos pacientes foram quantificados pelo método imuno-enzimático de ELISA conforme descrito por Gomes-Silva e colaboradores (2008) utilizando antígenos solúveis de *L. braziliensis* (MHOM/BR/195/2903), conjugado anti-IgG/IgG1/IgG2/IgG3/IgG4 de humano marcado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, California, USA), e cromógeno solúvel OPD (Invitrogen, California, USA). Os resultados foram expressos como índice ELISA ou densidade óptica.

Análise estatística

A significância em comparações simples entre os grupos será avaliada pelo teste t. Comparações de múltiplos grupos serão feitas por análise de variância (ANOVA) e análises de correlação serão avaliadas pelo teste de Pearson. Tratando-se de uma amostragem com distribuição fora da normalidade os dados serão analisados pelos testes Mann-Whitney e ANOVA para comparação entre medianas e o teste Spearman para análise de correlação (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Serão consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentarem valores de $p < 0,05$.

Resultados e discussão do apêndice

Os dados demográficos e clínicos dos pacientes incluídos no estudo foram demonstrados na Tabela 1. Pacientes provenientes de Paraty e do município do RJ foram avaliados. Apesar de dos dois municípios serem áreas endêmicas diferentes, já foi demonstrado que a LTA proveniente de Paraty apresenta as mesmas características clínicas e laboratoriais da doença desencadeada no município do RJ, provavelmente por causa do contexto epidemiológico semelhante relacionado com a região da Mata Atlântica (Viera-Gonçalves *et al.*, 2008). Dessa forma, nós optamos por não salientar os pacientes tratados com DC e DB, e avalia-los dentro do grupo geral dos pacientes LCC.

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos de pacientes curados de leishmaniose cutânea

Características	Frequência/ Percentual
Procedência	Paraty (50%) Rio de Janeiro (50%)
Localização da residência	DM (58,4%) FM (33,3%) PM (8,3%)
Idade	46,8 (34 – 68)
Gênero	F (75%) M (25%)
Número de lesões	1 (60%) 2 (30%) 3 (10%)
Diâmetro da lesão (cm ²)	8,3 (0,5 – 20)
Tempo de evolução (meses)	3 (1 – 6)
Tempo de cura (anos)	20,8 (12 – 26)
Desfecho clínico	Cura (100%)

F: feminino; M: masculino; DM: dentro da mata; FM: fora da mata; PM: próximo à mata.

As células T de memória são responsáveis por respostas mais rápidas e amplificadas quando o mesmo antígeno é encontrado novamente. Curiosamente, neste estudo foi observada uma manutenção dos compartimentos de células TME e TMC dos pacientes LCC nas análises feitas *in vitro* quando comparado com as avaliações *ex vivo* (Figura 2). Este é um resultado inesperado, principalmente porque já foi evidenciada que a expansão das células TME é uma tendência natural após a reestimulação da resposta imune (Zhou *et al.*, 2011, Keshavarz *et al.*, 2013, Pereira-Carvalho *et al.*, 2013). Dessa forma, sabendo que o espaço imunológico é finito, acredita-se que deva existir competição para a sobrevivência do *pool* de memória. Sendo assim, com o controle da carga parasitária e diminuição da estimulação antigênica, muitas células irão começar a competir pelo antígeno, podendo sofrer apoptose por falta de estímulo (negligência imunológica). Baseado nisso, o longo tempo de cura dos pacientes avaliados neste estudo pode ter contribuído para o estabelecimento de um equilíbrio homeostático neste compartimento, não havendo mais expansão destas células de memória sob um novo estímulo antigênico específico.

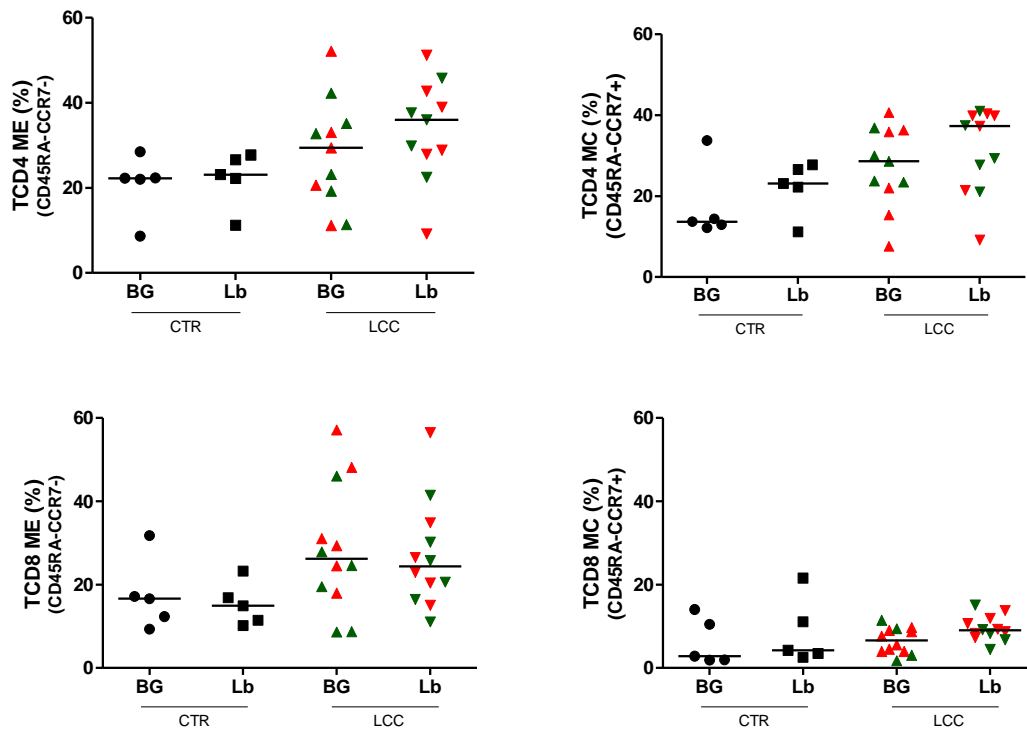


Figure 2. Avaliação numérica dos compartimentos de memória efetora e memória central em pacientes curados de leishmaniose cutânea. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram fenotipicamente caracterizadas como células T de memória efetora (CD45RA-CCR7-) e células T de memória central (CD45RA-CCR7+). As CMSP foram analisadas *ex vivo* (BG) e após estímulo *in vitro* com antígeno total de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb). Cada ponto representa um indivíduo. Os pontos em verde representam os pacientes LCC tratados com dose baixa. Os pontos em vermelho representam os pacientes LCC tratados com dose convencional. Medianas são representadas por linhas horizontais. LCC: pacientes curados de leishmaniose cutânea; CTR: indivíduos controles; ME: memória efetora; MC: memória central (Kruskal-Wallis com post-test de Tukey's).

Ao examinarmos o grau de ativação deste compartimento, foi observado um aumento da ativação das células TME e TMC nos pacientes LCC após o estímulo com *Lb* (Figura 3). Algumas possibilidades podem explicar este resultado discrepante: (1) a reexposição ao parasito; (2) a persistência parasitária. Alguns indivíduos participantes do nosso estudo podem estar sendo reexpostos constantemente, havendo então necessidade das células TME e TMC permanecerem ativadas, impedindo o desenvolvimento da doença e favorecendo a manutenção da cura.

Outra hipótese é que o elevado grau de ativação do compartimento de memória seja resultante da estimulação antigênica a partir da persistência parasitária após a cura. Dados da literatura já observaram a presença do parasito em indivíduos curados há mais de 10 anos (Schubach *et al.*, 1998, Mendonça *et al.*, 2004). Dessa forma, apesar de não ter sido notado uma expansão deste compartimento frente aos antígenos de *Lb* devido a uma provável homeostasia, a persistência parasitária pode ser outro fator associado com a ativação dos compartimentos de memória após longo tempo de cicatrização.

Uma das limitações deste trabalho é que ao avaliarmos o grau de senescência, nós não poderemos comparar o grupo controle com os pacientes LCC, pois eles apresentam médias de idades distintas. Por isso, só foi possível fazer as análises *ex vivo* e *in vitro* da senescência dos pacientes LCC. Os resultados demonstraram que após o estímulo não há variação da senescência das células do compartimento de memória efetora. Apesar de se esperar que após mais de 15 anos de cicatrização da lesão, estas células estariam exauridas, nós supomos que a manutenção da vitalidade destas células pode ser crucial para a sustentação da cura e para o não surgimento de novas lesões, caso estes pacientes forem reexpostos ao parasito.

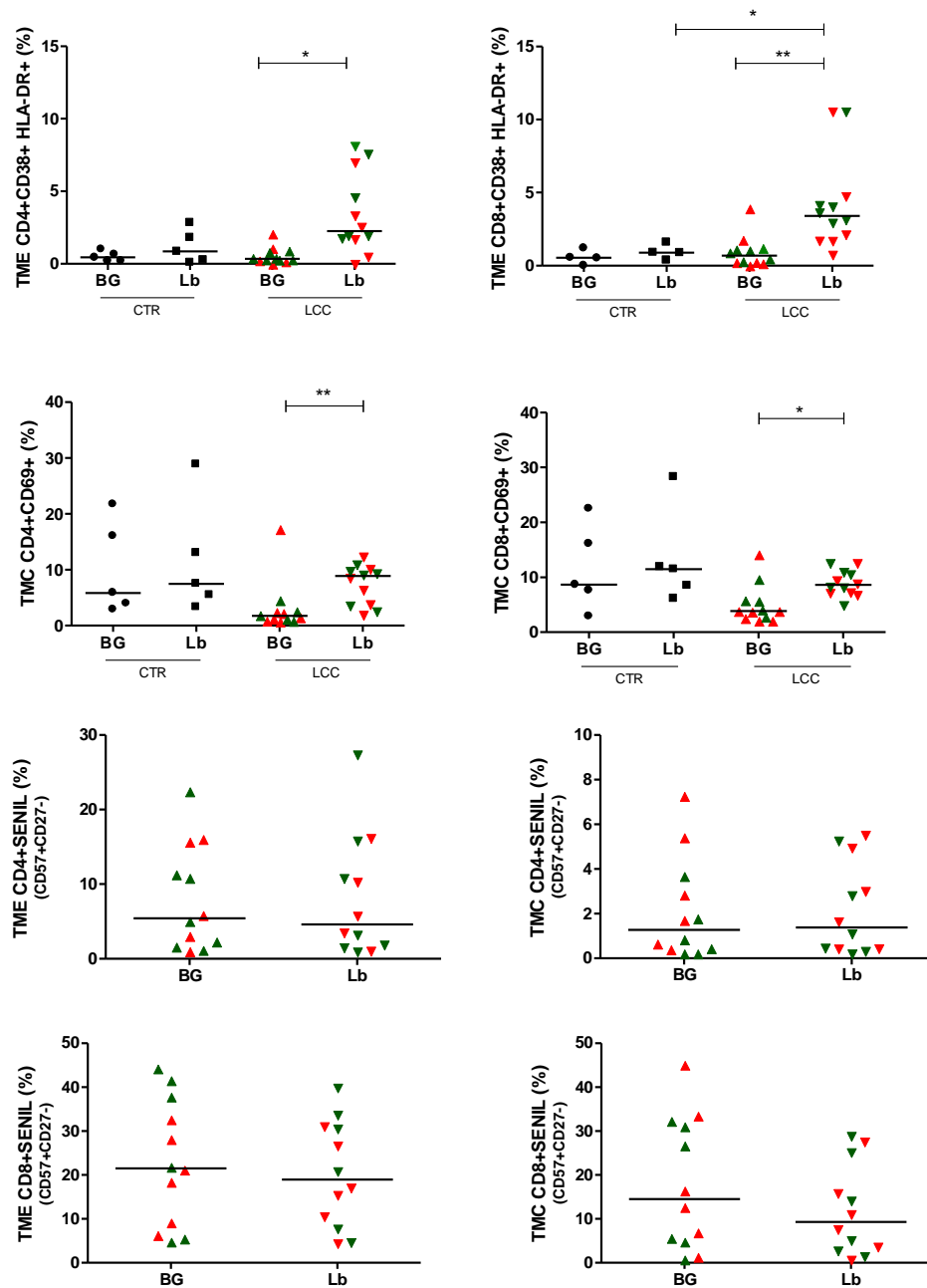


Figure 3. Avaliação dos níveis de ativação e senescência do compartimento de memória efetora em pacientes curados de leishmaniose. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram fenotipicamente caracterizadas como células T de memória efetora (CD45RA-CCR7-). A ativação (CD38+HLA-DR+) e a senescência (CD57+CD27-) foram analisadas *ex vivo* (BG) e após estímulo *in vitro* com *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb). Cada ponto representa um indivíduo. Os pontos em verde representam os pacientes LCC tratados com dose baixa. Os pontos em vermelho representam os pacientes LCC tratados com dose convencional. Medianas são representadas por linhas horizontais. LCC: pacientes curados de leishmaniose cutânea; CTR: indivíduos controles; ME: memória efetora; MC: memória central (Kruskal-Wallis com pos-test de Tukey's).

Comenta-se com frequência o papel dos linfócitos T na produção de mediadores importantes na resposta imune. Entretanto, estas células também podem desempenhar uma função essencial na ativação de linfócitos B. As respostas de anticorpos a antígenos proteicos precisam de linfócitos T auxiliares CD4+, que reconhecem o antígeno e estimulam ou auxiliam os linfócitos B a produzirem anticorpos. Assim, diante da resposta observada para células T, nós fomos avaliar a produção de imunoglobulinas e suas subclasses nos pacientes LCC 12-26 anos. Resultados anteriores (artigo 1) demonstraram que as subclasses IgG1 e IgG3 podem ser utilizadas como biomarcadores no acompanhamento clínico dos pacientes após 2 anos de cura (Fagundes-Silva *et al.*, 2012). Além disso, foi observado neste estudo que a porcentagem de indivíduos LCC que apresentavam títulos negativos para IgG, IgG1 e IgG3 foram 37%, 73% e 78%, respectivamente (Fagundes-Silva *et al.*, 2012). A análise da produção de Ig nos pacientes LCC 12-26 anos revelou que a frequência de amostras negativas ou indetectáveis para a maioria das Igs testadas variou de 80 a 100% (dados não mostrados). Estes dados sugerem que a diminuição da carga parasitária e a homeostasia alcançada após longo tempo de cicatrização das lesões pode ter contribuído para o aumento da frequência de amostras negativas de anticorpos anti-*Leishmania*. Apesar destes achados, dois pacientes apresentaram níveis de IgG, IgG1 e IgG3 anti-*Lb* positivos. Em função dos resultados apresentados no Artigo 1, é aceitável hipotetizar que a positividade destas subclasses poderia indicar que estes indivíduos estariam mais propensos a desenvolverem novas lesões ou até evoluírem para formas mais graves da doença, mesmo após longo tempo de cicatrização.

É importante mencionar ainda que dois pacientes LCC que apresentaram níveis indetectáveis de anticorpos também exibiram os menores graus de ativação das células TME. Entretanto, isto não foi observado para as células TMC. Na leishmaniose, já foi demonstrado que células TMC CD4 não necessitam da presença constante de parasitas para se desenvolverem. Já o compartimento de memória efetora parece depender da presença do patógeno para manter o seu *pool* de células de memória (Zaph *et al.*, 2004). Somado a isso, já foi notado que os títulos de anticorpos podem variar de acordo com o tempo de infecção e com a carga parasitária (Gutierrez *et al.*, 1991). Assim, sabendo que há uma conexão entre linfócitos T e B, é provável que a circulação de antígenos nestes pacientes seja muito reduzida ou até mesmo inexistente. Baseado nisso, e no fato

de que todos os pacientes LCC avaliados permaneceram curados, surge o questionamento: Será que a presença do parasito após a cicatrização das lesões é importante para o estabelecimento e sustentação da cura na leishmaniose cutânea? De fato, ainda não sabemos responder este questionamento. É provável que a presença ou ausência do parasito após a cura possa indicar qual o compartimento de memória deve ser preferencialmente expandido ou ativado por um candidato vacinal. Estudos posteriores precisam ser realizados a fim de tentar compreender melhor o papel da memória na conservação da cura após o tratamento da leishmaniose, visando futuramente o desenvolvimento de vacinas.

DISCUSSÃO GERAL DO CAPÍTULO 1

O manejo da leishmaniose cutânea (LC) deve apresentar dois objetivos: a cura das lesões e a prevenção de formas mais graves da doença. A LM não é uma manifestação clínica frequente no RJ. Estudos já revelaram que a incidência da forma mucosa nos pacientes do estado do Rio de Janeiro é inferior a 0,5% (Oliveira-Neto *et al.*, 2000) quando comparada a 9% na Amazônia (Camuset *et al.*, 2007) ou aos 3 a 5% classicamente descritos na literatura. Sendo assim, o risco de um paciente de LC evoluir para a forma mucosa nessa região parece ser bem reduzido. Baseado nisso, desde a década de 1990, estudos tem sido realizados a fim de comprovar que a utilização de baixas doses de antimônio pentavalente é eficaz na cura da doença. Um dos grandes pioneiros dessa ideia foi Oliveira-Neto. Este autor e colaboradores desenvolveram um estudo no ano de 2000, onde foram observadas que doses diárias de 5mg/Kg/dia, foram tão eficazes quanto doses de 20mg/kg/dia (Oliveira-Neto *et al.*, 2000). Também já foi demonstrado que a aplicação de doses intralesionais de antimônio pode levar à cura (Oliveira-Neto *et al.*, 1997, Vasconcellos *et al.*, 2012). Entretanto, ainda há uma grande lacuna de conhecimento a se preencher sobre o comportamento dos pacientes curados após este tratamento, fundamentalmente compreender a resposta imune desencadeada após longo tempo de cicatrização das lesões.

Apesar dos avanços nos estudos sobre a imunologia da leishmaniose, as perspectivas de controle ainda são dependentes de um progresso na obtenção de

melhores ferramentas que possam ser eficazes no controle do número de casos da doença. Nesse sentido, a estratégia profilática mais expressiva seria o desenvolvimento de uma vacina, capaz de proteger os indivíduos que vivem em áreas endêmicas, sob o risco de adquirir a infecção. No entanto, pouco se sabe sobre a resposta imune duradoura responsável pelo controle da leishmaniose em indivíduos curados. Uma hipótese é que esta deva apresentar um equilíbrio entre mecanismos inflamatórios e reguladores, bem como favorecer a diferenciação de linfócitos T específicos a *Leishmania* em células efetoras e em células de memória. Apesar disso, os poucos trabalhos que tem como enfoque a cura da leishmaniose tegumentar avaliam apenas a fase inicial de cicatrização da lesão pós-tratamento. Contudo, estudos já demonstraram que o equilíbrio da resposta imune só será alcançado após dois anos do contato inicial com o antígeno de *Leishmania* (Fagundes-Silva *et al.*, 2012, Pereira-Carvalho *et al.*, 2013, Fagundes-Silva em preparação), sugerindo que para o desenvolvimento de uma vacina seja necessário a realização de estudos que tenham como alvo a resposta imune gerada após esta fase inicial da cura.

Na leishmaniose, os estudos escassos descritos na literatura sobre resposta imune duradoura demonstraram, utilizando modelo experimental, que as células T CD4 de memória central (MC) não necessitam da presença constante de parasitas para se desenvolverem. Este padrão não foi observado para células T de memória efetora (ME), que dependem da presença do patógeno para manter o seu *pool* de células de memória (Zaph *et al.*, 2004). Por outro lado, Okwor e colaboradores (2008) sugeriram que a resposta imune proveniente de uma cura estéril após a infecção com *Leishmanias* sp. pode levar a uma má manutenção da memória imunológica. De fato, acredita-se que na leishmaniose tegumentar, o compartimento de células TME e TMC seja mantido sob a persistência parasitária, visto que a cura da infecção não é parasitológica. Entretanto, até o momento foi demonstrado apenas a expansão do compartimento de ME após a estimulação com antígenos de *Leishmania braziliensis* (*Lb*) (Pereira-Carvalho *et al.*, 2013, Carvalho *et al.*, 2013) . Baseado nisso, surge o questionamento: Será que o compartimento de células TMC não se desenvolve na presença do parasita? De fato, estas células devem ser importantes na manutenção da memória de indivíduos curados da LC. Entretanto, o real papel das células TMC na manutenção da cura na LTA ainda não é bem esclarecido. Alguns autores acreditam que existe um balanço entre células

TME e TMC, no qual pode influenciar na resposta a reinfecção ou mesmo na chance do indivíduo desenvolver uma forma mais grave da doença. De fato, muitas questões sobre a formação e manutenção das células TME e TMC no modelo experimental e na doença humana ainda precisam ser investigadas.

Interessantemente, em nosso estudo os compartimentos de células TME e TMC foram semelhantes entre os pacientes curados de LC após o tratamento e indivíduos saudáveis tanto nas análises *ex vivo* como após o estímulo *in vitro*. Por já ter sido estimulado pelo Ag-Lb durante a fase ativa, nós esperávamos observar que os indivíduos tratados de LC apresentassem uma expansão dos compartimentos de células TME ou TMC frente aos *Lb*. Possivelmente o elevado tempo de cura somado à baixa estimulação antigênica tenha promovido uma modulação para baixo da resposta imune. Acredita-se que com o aumento do tempo de cicatrização da lesão tenha ocorrido um equilíbrio homeostático da resposta imune, e com isso haja apenas uma manutenção da imunidade frente aos parasitos persistentes dos indivíduos.

Em consequência desses achados surge outra indagação: Se esses pacientes curados mantêm os compartimentos de memória semelhante ao de indivíduos saudáveis, o que fará com que eles não desenvolvam a doença se forem novamente expostos ao parasito? Talvez o aumento da ativação das células TME e TMC encontrado nos pacientes LCC 12-26 anos após o estímulo com Ag-Lb possa responder este questionamento. Dessa forma, sob um novo estímulo antigênico específico, as células TME irão gerar novas células efetoras que irão migrar para o local da infecção a fim de combater o parasito. E as células TMC irão proliferar e diferenciar em células com função efetora, tornando-se responsável pelo reabastecimento contínuo do compartimento de memória. Assim, a ativação destas células parece ser de fundamental importância para a manutenção da cura nestes pacientes.

É de conhecimento geral que linfócitos T, para se tornarem ativados, necessitam do contato com um antígeno através de células APC. Baseado nisso, nós nos questionamos se a ativação dos compartimentos de memória encontrada neste estudo seria proveniente da persistência parasitária ou de uma reexposição a leishmânia. Um dado importante a ser apontado é que a maioria dos indivíduos curados de LC reside numa área dentro da mata, o que pode ter favorecido a reexposição ao patógeno,

havendo então necessidade destas células permanecerem ativadas, impedindo o desenvolvimento da doença e favorecendo a manutenção da cura. Outra hipótese é que o elevado grau de ativação das células de memória seja resultante da estimulação antigênica a partir da persistência parasitaria após a cura. Esta hipótese parece ser mais fidedigna, visto que distintos estudos já demonstraram a persistência do parasito mesmo após longo tempo de cura clínica (Schubach *et al.*, 1998, Mendonça *et al.*, 2004).

Em indivíduos saudáveis e idosos, a ativação da imunidade e a inflamação desempenham um papel crucial na promoção do declínio gradual relacionado à idade do sistema imune, levando ao que chamamos de imunosenescência. Esse fenômeno pode ocorrer devido à estimulação crônica do sistema imune ou por uma infecção persistente, que não foi erradicada, como induzido pelo citomegalovírus ou o vírus do herpes (Esquenazi, 2008) . Em nosso trabalho, nós observamos que após o estímulo não há modificação da senescência das células do compartimento de TME ou TMC. Apesar de se esperar que após mais de 15 anos de cicatrização da lesão, estas células estariam exauridas, nós supomos na LTA não ocorra uma constante re-estimulação das células de memória como ocorre em algumas infecções virais, o que pode explicar a ausência de senescência no compartimento de memória dos pacientes.

Apesar da resposta a patógenos intracelulares ser mediada principalmente por linfócitos T, a completa exclusão de linfócitos B e da resposta imune humoral na defesa contra microrganismos intracelulares é um erro. Evidências demonstram que os linfócitos B e os anticorpos podem participar da formação da resposta imune contra agentes patogênicos cujo ciclo de vida requer um ambiente intracelular como *Chlamydia trachomatis*, *Salmonella enterica* e *L. major* (Su *et al.*, 1997, Mastroeni *et al.*, 2000, Woelbing *et al.*, 2006) .

Na leishmaniose, já foi observado que os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* spp podem variar de acordo com a carga parasitária, o tempo de exposição à doença, a forma de apresentação clínica e também com o perfil de resposta imune induzido por antígenos do parasito (Gutierrez *et al.*, 1991). Provavelmente, os níveis séricos das subclasses parecem estar condicionados à participação da resposta imune celular, mediada principalmente por células T CD4 do tipo Th1, as quais auxiliam no processo de indução de linfócitos B para produzirem as subclasses de imunoglobulinas. A

ativação do linfócito B de forma dependente de células T CD4 compreende sinalizações que resultarão na troca de isotipo, ou seja, o seguimento gênico correspondente à cadeia μ inicialmente transcrita será substituído pelas cadeias subseqüentes $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\alpha 1$, $\gamma 2$, $\gamma 4$, $\epsilon 1$ ou $\alpha 2$. Outra consequência da cooperação entre os linfócitos T e B é a hipermutação somática dos genes responsáveis pela codificação da região hipervariável que pode resultar no surgimento de clones de linfócitos B produtores de imunoglobulinas com menores constantes de dissociação (Reinhardt *et al.*, 2009). Dessa forma, o processo de troca de isotipo parece ser induzido pelo ambiente de citocinas onde os linfócitos B se encontram.

A fase ativa da LC é caracterizada pela produção de um perfil misto de citocinas, destacando os altos títulos de citocinas do tipo Th1 como TNF e IFN- γ . Após a cura, ocorre modulação da resposta imune capaz de controlar o perfil inflamatório observado durante a doença ativa (Gomes-Silva *et al.*, 2007). Como as subclasses são produzidas dependendo do padrão de citocina de cada fase clínica da doença, essas variações na síntese das citocinas também deve influenciar a secreção das imunoglobulinas.

Nesse contexto, alguns autores já haviam encontrado uma correlação positiva entre a cura clínica da LTA e o declínio do nível dos anticorpos anti-*Leishmania*. (Delgado *et al.*, 1996, Amato *et al.*, 1998, Brito *et al.*, 2001), assim como já foi sugerido que a manutenção de níveis elevados de anticorpos poderia estar relacionado com a reativação da doença ou a evolução para formas mais graves, uma vez que, após a cura clínica, os títulos das imunoglobulinas tendem a cair gradativamente (Mendonça *et al.*, 1988, Brito *et al.*, 2001, Castellano *et al.*, 2009). Todavia, a maior parte desses trabalhos apresentou uma baixa eficiência na detecção dos anticorpos, dificultando o uso desse parâmetro na prática clínica.

Em nosso estudo (Artigo 1), nós avaliamos a produção de imunoglobulinas em soro de pacientes com a forma ativa da LC e após a cura da infecção por *L. braziliensis*, incluindo indivíduos que foram tratados com protocolos alternativos de tratamento com antimônio pentavalente. Também foi observado uma redução dos títulos de IgG, IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* com o aumento do tempo de cura. Contudo, o diferencial desse estudo foi que a especificidade e a sensibilidade para detecção dos anticorpos foi de 97,8% e 100%, respectivamente, validando assim a metodologia empregada.

Inicialmente, foi notado que grande parte dos indivíduos apresentou títulos de IgG1 e IgG3 negativos (abaixo do *cut off*) após 24 meses de cura clínica (Artigo 1). Posteriormente, ao avaliarmos os níveis das imunoglobulinas após um longo tempo de cicatrização da lesão (LCC 12-26 anos), nós notamos que a maior parte dos casos avaliados apresentavam IgG e suas subclasses com títulos negativos ou indetectáveis (Apêndice de resultados – tópico: Resultados e discussão). Assim, a avaliação das subclasses parece refletir com precisão o perfil de resposta imune nos diferentes momentos clínicos da LTA. De fato, a detecção no soro das subclasses anti-*Leishmania* pode ser uma ferramenta importante para acompanhamento clínico dos pacientes após a cicatrização da lesão.

Em suma, esses resultados demonstraram que a manutenção da cura estável esteja mais associada à ativação dos compartimentos de memória do que a expansão destes frente ao estímulo por *Leishmania* spp. No entanto, este estudo não foi capaz de distinguir qual compartimento de memória deve ser ativado ou expandido por um candidato vacinal. Estudos posteriores precisam ser realizados a fim de compreender melhor o papel da memória na leishmaniose, visando principalmente o desenvolvimento de vacinas.

CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 1

✓ A detecção dos níveis séricos de IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* pode ser uma importante ferramenta para o acompanhamento clínico dos pacientes curados de leishmaniose cutânea.

✓ A manutenção da cura e o estabelecimento da resposta imune duradoura em pacientes curados de leishmaniose cutânea há longo tempo (LCC 12-26 anos) podem estar associadas à ativação das células T de memória efetora e central, sem que haja a renovação dos compartimentos de memória frente aos antígenos de *L. braziliensis*.

CAPÍTULO 2

Desafios atuais na LTA: particularidades inerentes as diferentes espécies de *Leishmania* que circulam na região Amazônica

Leishmaniose tegumentar Americana causada por Leishmania (Viannia) guyanensis

Os casos de Leishmaniose tegumentar Americana (LTA) reportados na região da Amazônia brasileira são associados a pelo menos sete espécies dermatópicas: *Leishmania guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi* (Lainson *et al.*, 1994, Silveira *et al.*, 2002). Apesar da elevada diversidade de espécies, estima-se que cerca de 80% dos casos de LTA nessa área seja causado por *L. guyanensis* (Grimaldi *et al.*, 1991, Lainson *et al.*, 1994, Romero *et al.*, 2001, Romero *et al.*, 2002, Figueira *et al.*, 2008, Figueira *et al.*, 2014).

Os principais vetores do parasito na região de Manaus são o *Lutzomyia umbratilis* e *Lu. anduzei*. O principal reservatório da *L. guyanensis* na Amazônia brasileira e também na Guiana Francesa é a preguiça (*Choloepus didactylus*) (Pajot *et al.*, 1982). No entanto, outros animais também são capazes de albergar esta espécie de *Leishmania*, sendo importante ressaltar o gambá (*Didelphis marsupialis*), pois este reservatório apresenta uma taxa de infecção acima dos 20% na região de Manaus (Arias *et al.*, 1981, Lainson *et al.*, 1983, Barret *et al.*, 1989). Além disso, este animal silvestre apresenta características comportamentais que propicia sua presença no ambiente peridomiciliar (Barret *et al.*, 1989, Andrade, 1997), se tornando uma fonte de infecção para os flebotomíneos.

A manifestação clínica mais frequente, causada por *L. guyanensis* (*Lg*), é a forma cutânea localizada, sendo que algumas de suas características clínicas diferem daquelas observadas na doença causadas por *L. braziliensis* (*Lb*). As lesões costumam ser mais numerosas, de menor diâmetro, apresentam maior carga parasitária, maior frequência de inflamação de linfonodos adjacentes e um alto índice de falha terapêutica (Lainson *et al.*, 1994, Romero *et al.*, 2001, Neves *et al.*, 2011). Estes fatos, em associação com o intenso parasitismo tecidual e com a baixa produção de IFN- γ observada em pacientes de LC, sugerem que indivíduos infectados por *Lg* apresentam uma incapacidade na formação de uma resposta imune específica adequada (Romero *et al.*, 2001, Matta *et al.*, 2009).

Já foi observado que, nas fases iniciais da doença, os pacientes de LC infectados com *L. guyanensis* (LC-*Lg*) desenvolvem uma resposta imunológica do tipo Th2, com produção de IL-4 e IL-13. A IL-13 desempenha um papel central na manutenção deste

perfil de resposta, principalmente por inibir a ação da cadeia $\beta 2$ do receptor de IL-12 (Borreau *et al.*, 2001). Em alinhamento com estes achados, os resultados do nosso grupo mostraram ainda que pacientes LC-*Lg* apresentaram uma baixa reatividade de linfócitos T aos antígenos de *Lg* quando comparada com a resposta de LC-*Lb* induzida por antígenos de *Lb* (Matta *et al.*, 2009). Tomados em conjunto, estes mecanismos potencialmente podem contribuir para a proliferação dos parasitas nas lesões e, conseqüentemente, para o estabelecimento da infecção (Borreau *et al.*, 2003).

Ao contrário do que é esperado quando há um predomínio de uma resposta tipo 2, tanto a produção de anticorpos específicos, quanto a intensidade de ligação a antígenos do parasito, são mais baixas na infecção por *Lg* do que naquela por *Lb* (Romero *et al.*, 2005, Matta *et al.*, 2009). Logo, os fatos mencionados indicam que esta espécie possa ser capaz de modular a resposta imune do hospedeiro, o que caracterizaria um mecanismo de escape da *Lg* aos processos efetores de resposta imune. Este déficit também poderia explicar o elevado percentual de falha terapêutica, que chega a 50% dos casos, independente do tratamento utilizado ser o antimonial ou a pentamidina (Neves *et al.*, 2011)

Em 2011 o interesse por co-infecção de *Leishmania* spp com vírus foi despertado por Ives e colaboradores, apesar desta associação já tem sido descrita desde anos 1980 (Taar *et al.*, 1988, Widmer *et al.*, 1989). Aqueles autores demonstraram que a presença de um vírus citoplasmático da *L. guyanensis*, denominado *Leishmania* RNA vírus (LRV), é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro, alterando o curso evolutivo da infecção. Experimentos *in vitro* mostraram que o reconhecimento da dupla fita de RNA do vírus pelo receptor *Toll-like* (TLR)-3, favorece a expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (Ives *et al.*, 2011). Apesar de não terem analisado pacientes com LM, estes resultados levaram os autores a sugerirem que a indução exacerbada da resposta imune devido à presença do LRV poderia incrementar um dano tecidual, predispondo a evolução para formas mucosas. Por outro lado, Pereira e colaboradores (2013) não observaram uma associação entre a presença do LRV1 e a gravidade da doença causada por *Lb*, o que indica que o papel do LRV na LTA ainda precisa ser mais bem discutido.

Recentemente, Aduai e colaboradores (2015) demonstraram uma associação entre o LRV1 e a falha terapêutica em casos de pacientes de LC provenientes do Peru e da Bolívia que foram infectados pela *Lb*. Contudo, não foi observada nenhuma relação entre o LRV e a resistência do parasito a droga, sugerindo fortemente que a falha terapêutica deve ter sido proveniente dos efeitos do vírus no metabolismo do hospedeiro. Da mesma forma, Borreau e colaboradores (2015) também mostraram essa mesma associação em casos de LC causada por *L. guyanensis*. Neste contexto, nosso grupo recentemente identificou uma possível associação entre o LRV e a falha terapêutica em um caso de infecção por *L. naiffi* proveniente da região Amazônica (Vieira-Gonçalves *et al.*, submetido – Manuscrito 1). Esses achados sugerem que o LRV1 possa modular a resposta imune do hospedeiro, influenciando na eficácia da droga.

Assim, a baixa reatividade imune medida por IDRM, produção de anticorpos anti-*Leishmania*, resposta proliferativa de linfócitos a antígenos do parasito, síntese de citocinas efectoras, conjuntamente favorecem a persistência do parasito, ao insucesso terapêutico e as frequentes recidivas (Guerra *et al.*, 2015). Além disso, a evolução para formas graves pode estar associada à presença de LRV (Ives *et al.*, 2011, Guerra *et al.*, 2011). Este cenário difere substancialmente daquele apresentado na infecção por *L. braziliensis* e por *L. amazonensis*, apontando para a importância de se considerar a etiologia do parasito para se estabelecer manejo clínico e vigilância mais adequados para cada espécie de *Leishmania* (Matta *et al.*, 2009).

Leishmaniose tegumentar Americana causada por
Leishmania (Leishmania) amazonensis

Outra espécie que merece destaque no cenário da LTA no Brasil é a *L. amazonensis* que apresenta uma baixa prevalência quando comparado com os casos humanos de *L. guyanensis* e a *L. braziliensis*. A *L. amazonensis* geralmente ocorre em toda a região Amazônica e em países vizinhos, apesar de já ter sido identificada nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (Lainson *et al.*, 1985, Costa *et al.*, 1998, Andrade *et al.*, 1999, Grisard *et al.*, 2000, Azeredo-Coutinho *et al.*, 2007).

Os principais insetos vetores associados a esta espécie são os flebotomíneos *Lu. reducta*, *Lu olmeca nociva* e *Lu flaviscutellata*, sendo este considerado o principal vetor apesar de apresentar hábitos alimentares pouco antropofílicos. Este fato explica a baixa prevalência da *L. amazonensis* entre os casos de LTA (Rebelo *et al.*, 1999). Os reservatórios naturais são principalmente espécies de roedores silvestres dos gêneros *Proechimys*, *Oryzomys* e *Wiedomys*, dos quais o parasita tem sido isolado somente na pele (WHO, 2010).

Um aspecto bastante particular da leishmaniose causada por *L. amazonensis* é que a doença pode cursar de uma forma espectral onde a partir da LC clássica (Moraes & Silveira 1994) pode haver uma evolução em diferentes graus para leishmaniose cutânea difusa (LCD) “boderline” e em raros casos para LCD (Silveira *et al.*, 2004, 2009).

Uma das possíveis causas dessas particularidades é o comprometimento imunológico do hospedeiro frente à infecção por *L. amazonensis*. Os pacientes com LCD apresentam resposta imune humoral com a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp e possuem níveis elevados de IgG4 (Ulrich *et al.*, 1995). Por outro lado, a resposta imune celular apresenta uma modulação específica contra antígenos de *Leishmania* spp. , sem comprometimento da resposta contra outros antígenos (Petersens *et al.*, 1982) . Isto é evidenciado pela ausência de proliferação linfocitária, uma vez que culturas de CMSP estimuladas com antígenos de *L. amazonensis* não respondem aos testes de proliferação celular e produção de IFN- γ (Barral *et al.*, 1995). Em contrapartida, é notada uma elevada produção de IL-10 nos casos de LCD (Qadoumi *et al.*, 2002). Estes dados indicam que uma das principais deficiências imunológica em LCD é a incapacidade em produzir IFN- γ e que a IL-10 pode ter um importante papel na modulação negativa na resposta desses pacientes (Bomfim *et al.*,1996).

Apesar do progresso recente no estudo dos aspectos imunológicos da LCD ainda há muitas questões a serem esclarecidas na imunopatogênese desta enfermidade. A própria raridade da doença limita as investigações já que o reduzido número de pacientes dificulta comparações.

Leishmaniose tegumentar Americana causada por Leishmania (Viannia) naiffi

Além das espécies citadas anteriormente, estudos têm mostrado que a *L. naiffi* surge como uma espécie cada vez mais frequente na região Amazônica (Grimaldi *et al.*, 1991, Figueira *et al.*, 2008, Figueira *et al.*, 2014). Todavia, apesar do aumento do número de casos, apenas 12 artigos sobre a *L. naiffi* são encontrados na literatura (dados do *Pubmed*, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Leishmania+naiffi).

A espécie *L. naiffi* foi originalmente descrita por Lainson e Shaw (1989) após ter sido isolada de um tatu (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará, Brasil. Apesar dos poucos casos descritos na literatura, a infecção humana por esta espécie tem sido associada com a LC na região Norte do Brasil, fundamentalmente no Pará, Amazonas e Rondônia (Naiff *et al.*, 1991, Grimaldi *et al.*, 1991), ainda que já ter sido observado casos da doença em Pernambuco (Recife) e no Mato Grosso (Felinto de Brito *et al.*, 2012). Ocorrências de *L. naiffi* já foram anotadas também em outros países da América Latina como Guiana Francesa, Martinica, Guadalupe e Suriname (Grimaldi *et al.*, 1991, Darie *et al.*, 1995, Pratlong *et al.*, 2002, van der Snoek *et al.*, 2009).

Os principais vetores da *L. naiffi* na Amazônia brasileira são *Psychodopygus ayrozai*, *Lu. squamiventris*, *Lu. paraensis*, *Lu. davisii* e *Lu. hirsuta* (Naiff *et al.*, 1991, Grimaldi *et al.*, 1991, Lainson *et al.*, 1994, Gil *et al.*, 2003, Lainson & Shaw 2005). Além disso, a *L. naiffi* também já foi isolada de *Lu. tortura* na área do Equador. Entretanto, nenhum caso de infecção humana foi reportado neste país (Kato *et al.*, 2008).

Os poucos relatos descritos na literatura geralmente associam a *L. naiffi* com baixa taxa de virulência em humanos, quando comparada com outras espécies do subgênero *Viannia*. De fato, o número de parasitos por célula foi menor na infecção por *L. naiffi*, o que pode explicar sua capacidade reduzida de sobreviver à atividade microbicida do macrófago humano (Campos *et al.*, 2008).

As lesões ocasionadas por essa espécie são descritas como únicas, pequenas e ulceradas, ocorrendo principalmente nas mãos, braços e pernas (Naiff *et al.*, 1991). Além disso, não existe relato de LM causada por *L. naiffi*. Assim, a leishmaniose tegumentar causada por essa espécie, aparentemente tem um curso clínico benigno e

uma boa resposta ao tratamento (Naiffi *et al.*, 1991, Pratlong *et al.*, 2002). Ademais, há evidências de que moradores de áreas florestais raramente apresentam lesões causadas por *L. naiffi*, sugerindo que a doença tem um curso auto-limitado. Nestes casos, a infecção seria benigna, imperceptível e que geralmente evolui para a cura espontânea, não sendo estes informados aos serviços de saúde. Sendo assim, os casos de *L. naiffi* podem ser muito mais elevados do que é reportado.

Estudos utilizando o *hamster* como modelo experimental também tem mostrado que a infecção com a *L. naiffi* frequentemente provoca lesões discretas ou não evoluem com sintomas (Lainson *et al.*, 1989). Corroborando com estes achados, já foram descritos em humanos dois relatos de cura espontânea causadas por *L. naiffi* (van der Snoek *et al.*, 2009). Nessa situação, dois soldados holandeses adquiriram LC durante um treinamento militar no Suriname. O tempo de evolução da doença foi de três e cinco meses. Nenhum tratamento foi realizado, e após quatro e seis semanas pós-diagnóstico, as lesões curaram-se espontaneamente. Em suma, esses achados têm ratificado a noção que a infecção por *L. naiffi* geralmente resulta numa manifestação benigna da doença.

Assim, o desenvolvimento de estudos que levem à compreensão do impacto dessa espécie no cenário epidemiológico da leishmaniose é de extrema importância. Este conhecimento poderá contribuir para o controle e vigilância da leishmaniose tegumentar nessa região.

OBJETIVOS

Geral

Descrever a ocorrência de *L. naiffi* entre trinta casos de Leishmaniose tegumentar Americana atendidos na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, Manaus, no período de 2011 a 2013.

Objetivos específicos

- a) Investigar a frequência da *L. naiffi* dentre os isolados provenientes de pacientes de LTA avaliados na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (Manaus) no período de 2011 a 2013.
- b) Avaliar as características clínico-evolutivas dos pacientes infectados por *L.naiiffi*.
- c) Investigar em isolados de *L. naiffi* de pacientes com leishmaniose cutânea, a presença do leishmaniavírus (LRV) e estabelecer associação da presença deste com o prognóstico da doença.
- d) Realizar uma revisão da literatura sobre os principais aspectos clínicos e epidemiológicos da infecção por *L. naiffi* na região Amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Artigo 2 (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz – MIOC-2015-0128.R2)

Título: *Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected?

Running title: *Leishmania naiffi* in Amazon region

Autores: Giselle Aparecida Fagundes Silva¹, Gustavo Adolfo Sierra Romero², Elisa Cupolillo³, Ellen Priscila Gadelha Yamashita⁴, Adriano Gomes-Silva^{1,5}, Jorge Augusto de Oliveira Guerra⁴, Alda Maria Da-Cruz¹ ^ζ.

¹Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, RJ, Brazil.

²Núcleo de Medicina Tropical – Faculdade de Medicina – Universidade de Brasília, DF, Brazil

³Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, RJ, Brazil

⁴Gerência de Leishmaniose – Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – AM, Brazil.

⁵Plataforma de Laboratório Multiusuário – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – FIOCRUZ, RJ, Brazil.

^ζ Correspondence: Alda Maria Da-Cruz, Av. Brasil 4365, Pavilhão Cardoso Fontes, térreo, Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ Brazil, CEP 21040-360 (e-mail: alda@ioc.fiocruz.br).

RESUMO

Na Amazônia brasileira, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é endêmica e apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, devido, em parte, à circulação de pelo menos sete espécies de *Leishmania*. Os poucos relatos de infecção por *L. (Viannia) naiffi* sugerem que sua ocorrência é rara, e os casos relatados apresentam um curso clínico benigno e uma boa resposta ao tratamento. Este estudo teve como objetivo reforçar a importância clínica e epidemiológica da *L. (V.) naiffi* na Amazônia (Manaus, Estado do Amazonas) e reportar a falha terapêutica em pacientes infectados com esta espécie. Uma amostragem de conveniência de trinta isolados de *Leishmania* spp provenientes de lesões cutâneas foi caracterizada por eleforese de multilocus enzimático. Como esperado, a espécie mais comum foi a *L. (V.) guyanensis* (20 casos). No entanto, observou-se um número relevante de pacientes com *L. (V.) naiffi* (8 casos), demonstrando, assim, que esta espécie não é tão rara na região. Nenhum paciente infectado com *L. (V.) naiffi* evoluiu para cura espontânea até o início do tratamento, o que indica que esta espécie pode não ter uma natureza auto-limitante como esperado. Além disso, dois dos pacientes apresentaram uma má resposta à terapia antimonial ou pentamidina. Assim, este estudo concluiu que os casos de LTA causados por *L. (V.) naiffi* não são tão raros como se pensava anteriormente, ou que esta espécie está atualmente se expandindo nesta região.

Key words: *Leishmania (Viannia) naiffi*, therapeutic failure, clinical outcome, multilocus enzyme electrophoresis, Amazon region.

Leishmania (Viannia) naiffi: rare enough to be neglected?

Giselle Aparecida Fagundes Silva¹, Gustavo Adolfo Sierra Romero²,
Elisa Cupolillo³, Ellen Priscila Gadelha Yamashita⁴, Adriano Gomes-Silva^{1,5},
Jorge Augusto de Oliveira Guerra⁴, Alda Maria Da-Cruz^{1/+}

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Núcleo de Medicina Tropical, Brasília, DF, Brasil ³Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ⁴Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado, Gerência de Leishmaniose, Manaus, AM, Brasil ⁵Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Plataforma de Laboratório Multiusuário, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

In the Brazilian Amazon, American tegumentary leishmaniasis (ATL) is endemic and presents a wide spectrum of clinical manifestations due, in part, to the circulation of at least seven Leishmania species. Few reports of Leishmania (Viannia) naiffi infection suggest that its occurrence is uncommon and the reported cases present a benign clinical course and a good response to treatment. This study aimed to strengthen the clinical and epidemiological importance of L. (V.) naiffi in the Amazon Region (Manaus, state of Amazonas) and to report therapeutic failure in patients infected with this species. Thirty Leishmania spp samples isolated from cutaneous lesions were characterised by multilocus enzyme electrophoresis. As expected, the most common species was Leishmania (Viannia) guyanensis (20 cases). However, a relevant number of L. (V.) naiffi patients (8 cases) was observed, thus demonstrating that this species is not uncommon in the region. No patient infected with L. (V.) naiffi evolved to spontaneous cure until the start of treatment, which indicated that this species may not have a self-limiting nature. In addition, two of the patients experienced a poor response to antimonial or pentamidine therapy. Thus, either ATL cases due to L. (V.) naiffi cannot be as uncommon as previously thought or this species is currently expanding in this region.

Key words: *Leishmania (Viannia) naiffi* - therapeutic failure - clinical outcome - multilocus enzyme electrophoresis - Amazon Region

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is highly endemic in the state of Amazonas (AM), Brazil. According to the Information System on Notifiable Diseases database, 18,675 Brazilian cases were reported in 2013, 8% of which occurred in the city of Manaus, AM (dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinanet/Ita/bases/ltabrnet.def). In this region, control of the disease is considered difficult because of the epidemiological characteristics and socioeconomic conditions associated with the sylvatic transmission cycle. In addition, environmental changes may influence infection dynamics, which makes control even more difficult. The circulation of at least seven *Leishmania* species has been observed in ATL in the Amazon Region. *Leishmania (Viannia) guyanensis* is the most prevalent species and is highly endemic in north of the Amazon River (Naiff et al. 1988, Grimaldi Jr et al. 1991, Lainson et al. 1994, Romero et al. 2001, 2002, Guerra et al. 2003). In this sense, several studies have

shown that the frequency of circulating species in this area varies (Table I) and that *Leishmania (Viannia) naiffi* seems to be more consistently isolated from cutaneous lesions in patients from this region.

L. (V.) naiffi was first described by Lainson and Shaw (1989) after being isolated from an armadillo (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Pará, northern Brazil. The few cases described in the literature usually associate *L. (V.) naiffi* with low rates of virulence in humans. Thus, it has been described that the disease evolves with a benign clinical course and a good response to treatment (Naiff et al. 1991, Pratlong et al. 2002). Furthermore, two cases of spontaneous healing of leishmaniasis caused by *L. (V.) naiffi* were described (van der Snoek et al. 2009). To date, however, no association between *L. (V.) naiffi* and mucosal leishmaniasis has been observed. *L. (V.) naiffi* cutaneous leishmaniasis lesions are usually ulcerated, unique, small and located on the hands, arms or legs (Naiff et al. 1991). In the same way, experimental studies have shown that *L. (V.) naiffi* frequently causes discrete or even nonapparent infections on hamsters' skin (Lainson & Shaw 1989). These findings were supported by in vitro analysis, which demonstrated that *L. (V.) naiffi* showed the lowest infection index and the highest nitric oxide production compared with other species of the *Viannia* subgenus (Campos et al. 2008). Then, the clinical and experimental information previously reported supported the idea that infection by *L. (V.) naiffi* commonly results in benign manifestations. Therefore, the present study aimed to strengthen the awareness of the clinical and epidemiological importance of *L. (V.) naiffi* in the Amazon Region and to report therapeutic failure associated with this species.

doi:

Financial support: IOC/FIOCRUZ, PAPERJ/VPPDT/FIOCRUZ, FAPERJ-APQ1 (E-26/110.497/2011), CNPq (458858/2014-5) AMD-C and EC are CNPq and FAPERJ (CNE) research fellow.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the paper.

+ Corresponding author: alda@ioc.fiocruz.br

Received 27 March 2015

Accepted 14 July 2015

TABLE I
Frequency of *Leishmania* species associated with American tegumentary leishmaniasis in Amazon Region

<i>Leishmania</i> species	Cases (n)	Relative proportion within the study (%)	Region of endemicity state (city)	Reference
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	61	64.9	Amapá, Amazonas, Pará and Rondônia	Grimaldi Jr et al. (1991)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	15	16		
<i>L. (V.) naiffi</i>	10	10.6		
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	6	6.4		
Not identified	2	2.1		
<i>L. (V.) guyanensis</i>	69	97.2	Amazonas	Romero et al. (2002)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	2	2.8	(Manaus)	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	16	53.3	Acre	da Silva et al. (2006)
<i>L. (V.) lainsoni</i>	12	40	(Rio Branco)	
<i>L. (V.) guyanensis</i>	1	3.3		
Hybrid: <i>L. (V.) lainsoni/ L. (V.) naiffi</i>	1	3.4		
<i>L. (V.) guyanensis</i>	10	76.9	Amazonas	Figueira et al. (2008)
<i>L. (V.) naiffi</i>	3	23.1	(Manaus)	
<i>L. (V.) guyanensis</i>	8	80	Amazonas	Figueira et al. (2008)
<i>L. (V.) naiffi</i>	2	20	(Rio Preto da Eva)	
<i>L. (V.) guyanensis</i>	80	89	Amazonas	Figueira et al. (2014)
<i>L. (L.) amazonensis</i>	7	7.8	(Rio Preto da Eva)	
<i>L. (V.) naiffi</i>	3	3.3		
<i>L. (V.) braziliensis</i>	11	25.6	Pará	Jennings et al. (2014)
<i>L. (V.) guyanensis</i>	6	13.9	(lower Amazon Region)	
<i>L. (V.) shawi</i>	4	9.3		
<i>L. (V.) shawi</i>	7	16.3		
<i>L. (V.) lainsoni</i>	6	13.9		
<i>L. (L.) amazonensis</i>	2	4.7		
Hybrid: <i>L. (V.) guyanensis/ L. (V.) shawi shawi</i>	7	16.3		

Thirty *Leishmania* spp samples were isolated from cutaneous lesions of patients from different surrounding areas of Manaus. Samples were collected during 2011-2013 at the Heitor Vieira Dourado Tropical Medicine Foundation (FMT-HVD), a reference centre for tropical diseases in AM. Skin lesion fragments obtained by biopsy were cultured in Novy-Neal-Nicolle medium and *Leishmania* was isolated. Parasites were sent to the *Leishmania* Collection from the Oswaldo Cruz Institute for species identification. This study was approved by the Research Ethical Committee of FMT-HVD (protocol 21273572). Identification of *Leishmania* spp isolates was based on multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) and performed on agarose gel and allelic variations were tested for the following enzymes: 6-phosphogluconate dehydrogenase (EC1.1.1.44), glucose-6-phosphate dehydrogenase (E.C.1.1.1.49) and isocitrate dehydrogenase (E.C.1.1.1.42). The method was performed in accordance with the conditions described by Cupolillo et al. (1994).

Four species were identified: *L. (V.) guyanensis* 66.7% (20/30), *L. (V.) naiffi* 26.7% (8/30), *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 3.3% (1/30) and *Leishmania (Viannia) shawi* 3.3% (1/30). As expected, the most

common species was *L. (V.) guyanensis*. Surprisingly, none of the isolates were characterised as *L. (V.) braziliensis*. According to Romero et al. (2002), cases of ATL caused by *L. (V.) braziliensis* are uncommon in nearby Manaus. Interestingly, the frequency of *L. (V.) naiffi* was 26.7% (8/30), which indicates that this species could be an etiologic agent of CL more frequent than expected in this region. These data corroborate those obtained by Figueira et al. (2008), who observed a relevant number of CL associated with *L. (V.) naiffi* in the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus.

Several methods have been used to define *Leishmania* species (Degrave et al. 1994, Romero et al. 2001, Coelho et al. 2011). Nevertheless, MLEE remains one of the main tools for characterising *Leishmania* because it reveals polymorphisms that express phenotypes of population variations and taxonomically classify the different species of this parasite (Cupolillo et al. 1994). Precise identification of *Leishmania* spp is fundamental to understanding the disease's epidemiology; improving the current knowledge concerning its pathology and the control measures (Coelho et al. 2011). Thus, it is likely that the transmission of *L. (V.) naiffi* in the Amazon Re-

a OU b?

a OU b?

TABLE II
Demographic and clinical data of patients infected with *Leishmania (Viannia) naiffi*

Patient ID	Gender	Age	Lesions (n)	Location of lesion	Disease durations (days)	Presence of amastigotes	Treatment	Outcome
1	M	36	1	Upper limb	30	+	Antimonial (20 days) + antimonial (30 days)	Failure
2	M	39	1	Lower limb	90	+	Pentamidine (3 doses) + pentamidine (3 doses)	Failure
3	M	59	1	Upper limb	60	+	Antimonial (20 doses)	Cure
4	M	30	1	Upper limb	15	+	Antimonial (20 doses)	Cure
5	M	29	4	Upper limb	20	+	Pentamidine (3 doses)	Cure
6	M	39	2	Lower limb	30	+	Pentamidine (3 doses)	Cure
7	M	52	2	Face	30	+	Antimonial (20 doses)	Cure
8	M	15	1	Lower limb	30	+	Pentamidine (3 cycles)	Cure

F: female; M: male; +: positive smears of scarifications.

gion is more frequent than has been reported. In this connection, the CL patients infected by *L. (V.) naiffi* (n = 8) are described below. All of them were men with a mean age of 37.4 ± 13.7 years (median = 37.5 years). The disease duration was 30 ± 24.8 days [median = 30 days (95% confidence interval: 22.5 - 52.5)]. The number of lesions ranged from one-four. Four subjects were initially treated with antimony and four individuals were initially treated with pentamidine (antimony: 10-20 mg Sb⁺⁵/kg/day for 20/30 consecutive days; pentamidine: 3 doses of 4 mg/kg with an interval of 72 h between doses) (Table II). Two of the patients experienced a poor response to antimony or pentamidine therapy.

Previous studies have suggested that the *Leishmania* species and the endemic area examined can be influenced by the cure rate (Romero et al. 2001, Arevalo et al. 2007). In a recent study conducted in AM, the cure rates in *L. (V.) guyanensis* infection after treatment with antimony or pentamidine were 55.5% and 58.1%, respectively (Neves et al. 2011). To date, all of the studies described in the literature have associated infection by *L. (V.) naiffi* with spontaneous healing or a good therapeutic response. However, the data obtained by our group showed therapeutic failure in a patient who was infected by *L. (V.) naiffi* and treated with pentamidine (R Vieira-Gonçalves, unpublished observations). Corroborating this finding, we herein illustrate two new CL cases that are associated with *L. (V.) naiffi* infection and presented pentamidine or antimony-resistant lesions (Table II),

which indicates that the clinical evolution of infection from this species may not be as favourable as described. No cases of spontaneously healing was seem probably because the short period of disease duration until the diagnosis establishment. The cases of *L. (V.) naiffi* reported herein underline that this species may not have a self-limiting nature, as previously described (Naiff et al. 1991, van der Snoek et al. 2009), and could not be as uncommon as referenced (Grimaldi Jr et al. 1991, Figueira et al. 2014). The present results highlight the importance of characterising *Leishmania* spp in areas that exhibit a sympatric circulation of *Leishmania* spp parasites to define the epidemiological importance of each of these species to human disease. This knowledge can improve the surveillance and therapeutic approaches used to achieve a clinical cure.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the technician of the Leishmaniasis Management of FMT-HVD, specially to Yolanda F Noguth and Maria Rita Teixeira, and to Sabrina S Guimarães, for technical assistance in the field and laboratory work.

REFERENCES

- Arevalo J, Ramirez L, Adai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, de Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A 2007. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis* 195: 1846-1851.

- Campos MB, Gomes CMC, de Souza AA, Lainson R, Corbett CE, Silveira FT 2008. In vitro infectivity of species of *Leishmania* (*Viannia*) responsible for American cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Res* 103: 771-776.
- Coelho LIC, Paes M, Guerra JA, Barbosa MG, Coelho C, Lima B, Brito ME, Brandão Filho SP 2011. Characterization of *Leishmania* spp causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res* 108: 671-677.
- Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 50: 296-311.
- da Silva ACT, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GA 2006. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health* 11: 1388-1398.
- Degrave W, Fernandes O, Thiemann O, Wincker P, Britto C, Cardoso A, Pereira JB, Bozza M, Lopes U, Morel C 1994. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* using the polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 367-368.
- Figueira LP, Soares FV, Naiff MF, Simas SS, Espir TT, Pinheiro FG, Franco AM 2014. Distribuição de casos de leishmaniose tegumentar no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Rev Patol Trop* 43: 173-181.
- Figueira LP, Zanotti M, Pinheiro FG, Franco AM 2008. Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, state of Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 512-514.
- Grimaldi Jr G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D 1991. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals and sand flies in the Amazon Region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 44: 645-661.
- Guerra JAO, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM 2003. Clinical and diagnostic aspects of American tegumentary leishmaniasis in soldiers simultaneously exposed to the infection in the Amazon Region. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 587-590.
- Jennings YL, de Souza AA, Ishikawa EA, Shaw J, Lainson R, Silveira F 2014. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon Region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* × *Leishmania* (*Viannia*) *shawi shawi*. *Parasite* 21: 39.
- Lainson R, Shaw JJ 1989. *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (*L.*) in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp* 64: 3-9.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAY 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 435-443.
- Naiff RD, Freitas RA, Naiff MF, Arias JR, Barrett TV, Momen H, Grimaldi Jr G 1991. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 317-321.
- Naiff RD, Talhari S, Barrett TV 1988. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 529-530.
- Neves LO, Talhari AC, Gadelha EP, Silva Jr RM, Guerra JA, Ferreira LC, Talhari S 2011. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol* 86: 1092-1101.
- Pratlong F, Deniau M, Darie H, Eichenlaub S, Pröll S, Garrabe E, le Guyadec T, Dedet JP 2002. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania naiffi* is wide-spread in South America. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 781-785.
- Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Cupolillo E, Toaldo CB, Macedo VO, Fernandes O 2001a. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*. *Acta Trop* 79: 225-229.
- Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO 2001b. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 65: 456-465.
- Romero GA, Ishikawa E, Cupolillo E, Toaldo CB, Guerra MV, Paes GM, Macêdo VO, Shaw JJ 2002a. Identification of antigenically distinct populations of *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. *Acta Trop* 82: 25-29.
- Romero GA, Ishikawa E, Cupolillo E, Toaldo CB, Guerra MV, Paes MG, Macêdo VO, Shaw JJ 2002b. The rarity of infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, who have cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 131-136.
- SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação 2004. Leishmaniose. Available from: dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/.
- van der Snoek EM, Lammers AM, Kortbeek LM, Roelfsema JH, Bart A, Jaspers CA 2009. Spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania naiffi* in two Dutch infantry soldiers. *Clin Exp Dermatol* 34: e889-e891.

Case report

Título: First report of treatment failure in a cutaneous leishmaniasis patient infected by *Leishmania (Viannia) naiffi*

Autores: Vieira-Gonçalves R^{*,#}, Fagundes-Silva GA^{*,#}, Heringer JF^{*}, Fantinatti M^{*}, Da-Cruz AM^{*}, Oliveira-Neto MP^{**}, Guerra JAO^{***}, Gomes-Silva A^{*,**,§}

Both authors contributed equally to this work.

* Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil ** Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil *** Gerencia de Leishmaniose, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil.

§ *Correspondence:* Adriano Gomes-Silva, Av. Brasil 4365, Pavilhão Cardoso Fontes, térreo, Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ Brazil, CEP 21040-360 (e-mail: adriano.gomes@ini.fiocruz.br).

RESUMO

Nós relatamos o caso clínico de um paciente, homem de 32 anos de idade, proveniente do Rio de Janeiro, e que foi infectado na região Amazônica pela *Leishmania (Viannia) naiffi*. Geralmente, os casos de leishmaniose tegumentar causados por *L. naiffi* evoluem com uma boa resposta terapêutica, utilizando tanto antimônio como pentamidina. Surpreendentemente, após o tratamento com pentamidina, este paciente evoluiu com falha terapêutica. Neste caso, as razões para a falha terapêutica não foram conclusivas. Uma hipótese para este desfecho clínico é a presença de um vírus denominado *Leishmania* RNA vírus (LRV) neste isolado proveniente da lesão cutânea deste paciente. Apesar desse achado, estudos posteriores precisam ser realizados a fim de compreender melhor o papel do LRV na infecção por *L. naiffi* e se este pode alterar a natureza benigna desta espécie.

INTRODUCTION

Leishmania (Viannia) naiffi was first isolated in the armadillo (*Dasypus novemcinctus*) in 1989 by Lainson & Shaw¹ in the Pará state (Brazilian Amazon). Soon after, this species was detected in a human CL patient originating from the same state^{8,9}. This species has not usually been implicated as etiological agent of cutaneous leishmaniasis (CL). Few *L. naiffi* CL cases have been reported in Ecuador, Peru, French Guiana, Martinique and Suriname², most of which involved military personnel or tourists from non-endemic areas that entered forests³. Although it is less common, human infection due to *L. naiffi* has also been reported in Brazil, mainly in the Amazon region. In these reports the disease developed with a favorable prognosis, sometimes evolving toward spontaneous healing³ and exhibited a good therapeutic response to either pentavalent antimonials or pentamidine². Herein, we describe a case of a patient who evolved with a pentamidine-resistant CL lesion caused by *L. naiffi*.

CASE REPORT: A 32-year-old male military personnel in Rio de Janeiro state (RJ), Brazil, was infected in September 2009 during his military training in the Amazon region (Manaus, AM). Thirty days later, a papular lesion approximately 0.5 cm in diameter was noted on his left hand. No lymphadenopathy was detected. The patient was treated with a three-day course of pentamidine 4 mg/kg at “Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado” (Amazonas, Brazil); however, treatment was not successful, and an active lesion persisted (Figure 1A). In March 2010, the patient returned to military service in RJ and was submitted to surgical removal of the entire lesion at the “Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/Fiocruz” (Rio de Janeiro, Brazil). The lesion tissue was divided into two fragments for the following analysis: 1) histopathology; 2) parasite isolation in Novy-Neal-Nicolle (NNN) culture medium. Pseudo-epitheliomatous squamous hyperplasia and chronic granulomatous dermatitis were observed, but no amastigotes were found. *Leishmania* spp isolation was positive and parasites were sent to the *Leishmania* Collection from the Oswaldo Cruz Institute for species identification. Parasite was identified as *L. naiffi* based on multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) performed on agarose gel and allelic variations were tested for the following enzymes: 6-phosphogluconate dehydrogenase

(6PGDH, EC1.1.1.44) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, E.C.1.1.1.49). The method was performed in accordance with the conditions described by Cupolillo et al. (1994).

One month after the surgical procedure, and without receiving another round of therapy, no sign of active disease was detected. The scar remained completely healed until three years after surgery (Figure 1B, C), at which time clinical follow-up was stopped. Anti-*Leishmania* immunoglobulin G (IgG), IgG1 and IgG3 were detected using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method⁵. Despite the therapeutic failure, immunoglobulin levels remained negative up to two years after the patient was treated. However, *Leishmania* RNA virus type 1 (LRV1) was detected in the cultured parasite using a sequencing technique. LRV1 cDNA was amplified using primers: F: 5'-CTGACTGGACGGGGGGTAAT-3' and R: 5'-CAAACACTCCCTTACGC-3' and the PCR products were sequenced using the ABI Prism™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit and run on an ABI 3730 automatic DNA sequence (Applied Biosystems, Foster City, CA). The sequences obtained were submitted to BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) in order to identify their similarity with sequences of the GenBank. Sequence alignment was performed using CLUSTAL W in MEGA version 4.0 (<http://www.megasoftware.net>). The sequence analysis revealing 91% identity to LRV of three sequences from NCBI (accession numbers NC_003601.1, AF230886.1, U23810.1) (Figure 1D).

DISCUSSION

In this report a CL case due to *L. naiffi* identified by MLEE that evolved with pentamidine treatment failure is first described. The frequency of human *L. naiffi* infection is likely underreported due to the failure of health systems to isolate and identify *Leishmania* species as recommended by the World Health Organization (WHO)¹⁴. The precise identification of the *Leishmania* species is essential to understanding the epidemiological, clinical and pathological aspects of infection, with a consequent impact on therapy and disease control¹⁰.

Recent reports point that human infection due to *L. naiffi* is less common than other species. In the region of Manaus, prevalences of 4%, 8%, 14% and 73% were observed for *L. naiffi*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*, respectively¹⁰. However, higher frequencies for *L. naiffi* infections (20%) were also detected by others¹¹.

L. naiffi CL lesions are usually ulcerated, unique, small and located on the hands, arms or legs⁸. The same way, experimental studies have shown that *L. naiffi* frequently causes discrete or even unapparent infections on the skin of hamsters¹. To our knowledge, mucosal leishmaniasis has not yet been reported for this species.

None of the previously mentioned studies has attempted to identify the clinical outcome aspects of *L. naiffi* infections as the response to treatment. *L. naiffi* therapeutic response is largely unknown, and the available data mention the benign course of *L. naiffi* infection. However, herein a therapeutic pentamidine failure in a *L. naiffi* CL case was reported. Indeed, it is intriguing to note that complete lesion healing was achieved after surgical removal.

It is known that treatment failure may be related to intrinsic factors of the parasite or the immune response induced by *Leishmania* antigens. Recently it has been shown that the presence of LRV might be associated with the severity of leishmaniasis. Studies have suggested that LRV reduces sensitivity to oxidative stress, which may contribute to the decreased effectiveness of drugs¹⁹. Furthermore, this double-stranded RNA virus is known to increase the transcription of proinflammatory cytokines⁶, which in turn promotes tissue damage and poor prognosis. Others authors have described the presence of LRV in *Leishmania* species^{15-17,20}. Here, we first evidenced the presence of LRV1 in the specie *L. naiffi*. If it had any influence in the therapy failure it is unknown, and more studies are needed for better understanding. This study reinforces the importance of using reliable methods for *Leishmania* spp identification to define the true epidemiological importance of *L. naiffi* as an etiological agent of tegumentary leishmaniasis in South America. This is, especially important in the Amazon region where cure rate of CL is approximately 50%²¹. Thus, the identification of possible factors associated with treatment failure should allow better clinical monitoring of patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the technical team from “Gerência de Leishmaniose – Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado”. We also thank the “Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de *Leishmania*” (IOC), FIOCRUZ and the sequencing platform (IOC).

FINANCIAL SUPPORT

This work was funded by IOC/FIOCRUZ internal funds, PAPERJ/VPPDT/FIOCRUZ (www.ioc.fiocruz.br) and by the “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro” (FAPERJ-APQ1) (grant number E-26/170•844/2003) (www.faperj.br) and “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) (number 458858/2014-5). AMDC is a CNPq and FAPERJ (CNE) research fellow. AGS is a PhD candidate sponsored by the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq)/FIOCRUZ research visitor program. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

POTENCIAL CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no commercial or other association that might pose a conflict of interest.

REFERENCE

1. Lainson R, Shaw JJ, 1989. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasyus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp* 64: 3-9.
2. Pratlong F, Deniau M, Darie H, Eichenlaub S, Pröll S, Garrabe E, le Guyadec T, Dedet JP, 2002. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania naiffi* is wide-spread in South America. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 781-785.

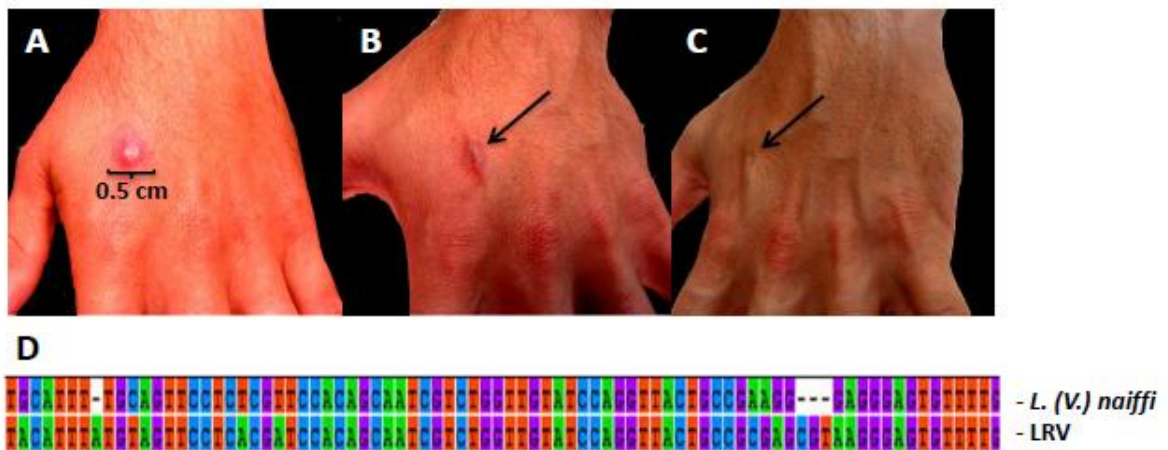
3. van der Snoek EM, Lammers AM, Kortbeek LM, Roelfsema JH, Bart A, Jaspers CA, 2009. Spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania naiffi* in two Dutch infantry soldiers. *Clin Exp Dermatol* 34: e889-91.
4. Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H, 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 50: 296-311.
5. Fagundes-Silva GA, Vieira-Goncalves R, Nepomuceno MP, de Souza MA, Favoreto S Jr, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A, 2012. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol* 34: 486-491.
6. Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, Zangger H, Revaz-Breton M, Lye LF, Hickerson SM, Beverley SM, Acha-Orbea H, Launois P, Fasel N, Masina S, 2011. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science* 11: 775-778.
7. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 11: 4673-4680.
8. Naiff RD, Freitas RA, Naiff MF, Arias JR, Barrett TV, Momen H, Grimaldi Júnior G, 1991. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 317-321.
9. Panamerican Health Organization, 1997. Cooperation of the Pan American Health Organization in the Health Sector Reform Processes. Washington, DC: PAHO.
10. Camara Coelho LI, Paes M, Guerra JA, Barbosa Md, Coelho C, Lima B, Brito ME, Brandão Filho SP, 2011. Characterization of *Leishmania spp.* causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res* 108: 671-677.

11. Figueira Lde P, Zanotti M, Pinheiro FG, Franco AM, 2008. [Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas]. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 512-514.
12. Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa Md, Ferreira LC, 2011. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e980.
13. Campos MB, De Castro Gomes CM, de Souza AA, Lainson R, Corbett CE, Silveira FT, 2008. *In vitro* infectivity of species of *Leishmania (Viannia)* responsible for American cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Res* 103: 771-776.
14. Control of the leishmaniases, 1990. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 793:1-158.
15. Tarr PI, Aline RF Jr, Smiley BL, Scholler J, Keithly J, Stuart K, 1988. LR1: a candidate RNA virus of *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9572-9575.
16. Stuart KD, Weeks R, Guilbride L, Myler PJ, 1992. Molecular organization of *Leishmania* RNA virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 15: 8596-600.
17. Salinas G, Zamora M, Stuart K, Saravia N, 1996. *Leishmania* RNA viruses in *Leishmania* of the *Viannia* subgenus. *Am J Trop Med Hyg* 54: 425-429.
18. Pereira Lde O, Maretti-Mira AC, Rodrigues KM, Lima RB, Oliveira-Neto MP, Cupolillo E, Pirmez C, de Oliveira MP, 2013. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania* RNA virus 1 infection in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 665-667.
19. Hartley MA, Ronet C, Zangger H, Beverley SM, Fasel N, 2012. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. *Front Cell Infect Microbiol* 2:99.
20. Scheffter SM, Ro YT, Chung IK, Patterson JL, 1995. The complete sequence of *Leishmania* RNA virus LRV2-1, a virus of an Old World parasite strain. *Virology* 212: 84-90.

21. Neves LO, Talhari AC, Gadelha EP, Silva Júnior RM, Guerra JA, Ferreira LC, Talhari S, 2011. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol* 86:1092-101.

LEGEND

Figure 1: *Leishmania (Viannia) naiffi* cutaneous leishmaniasis lesion on the patient's hand after pentamidine therapy failure (A) and progressive healing after its surgical removal (scar one (B) and three (C) years after surgical removal). Alignment of *Leishmania* RNA virus LRV sequences from patients infected with *L. naiffi*; the gray area indicates all matching nucleotides (D). The *L. naiffi* sequences are similar to the LRV1 sequences.



DISCUSSÃO GERAL DO CAPÍTULO 2

Em nosso estudo, nós observamos que a infecção por *L. naiffi* parece não ser tão rara como descrito por alguns autores, visto que foi demonstrado que dentre uma série de 30 casos de LC, oito pacientes estavam infectados por *L. naiffi*. Conjuntamente com os resultados de outros autores (Grimaldi *et al.*, 1991, Figueira *et al.*, 2008, 2014), pode-se supor a ocorrência de uma elevada frequência desta espécie dentre isolados da região da grande Manaus, indicando que a *L. naiffi* pode não ser tão incomum como se acredita (Artigo 1).

Alguns fatores podem ser apontados para se entender porque a ocorrência de *L. naiffi* é negligenciada na região: (1) ausência de uma rotina de isolamento do parasito a partir das lesões para posterior caracterização dos isolados de *Leishmania*; (2) as metodologias que vem sendo empregadas como, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR), não está validada na literatura para diferenciar as espécies de *Leishmania* spp, sobretudo aquelas do subgênero *Viannia*. Além disso, mudanças ambientais na região e a modificação ou perda dos habitats naturais dos vetores ou dos hospedeiros da infecção podem ter contribuído para o aumento do número de casos de *L. naiffi* na região.

Segundo o Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar o diagnóstico é principalmente clínico e epidemiológico, já que os métodos de confirmação parasitológica, exame direto e isolamento em cultura, nem sempre estão disponíveis nos serviços básicos de saúde. Com isso, na maioria das áreas endêmicas no Brasil, a caracterização das espécies de *Leishmania* spp não é realizada. Em face a esta realidade, os inquéritos epidemiológicos sobre a prevalência das espécies acabam ficando mais no âmbito da pesquisa científica.

É indiscutível que a identificação correta desses parasitos é importante, não apenas para um melhor entendimento da epidemiologia desses agentes, mas também para que seja feito o tratamento adequado aos pacientes, já que certos parasitos podem causar manifestações graves, como a leishmaniose mucosa ou leishmaniose cutânea difusa.

Inicialmente as diferentes espécies de *Leishmania* eram classificadas através de critérios extrínsecos tais como geográficos, clínicos, biológicos e epidemiológicos. Desde o final da década de oitenta iniciou-se uma classificação baseada em características bioquímicas do parasito - análise isoenzimática ou *Multi Locus Enzyme Electrophoresis* - MLEE. Atualmente a análise isoenzimática é considerada como o método de referência para a identificação das diferentes espécies de *Leishmania*, sendo realizada em laboratórios especializados, como os centros de referência, de forma a poderem identificar novos zimodemos, de acordo com a sua nomenclatura (Gramiccia *et al.*, 1992; Elisa *et al.*, 1994, Kallel *et al.*, 2001; Martin-Sanchez *et al.*, 2004). Apesar de ser um dos métodos mais fidedignos, apresenta limitações e uma das principais críticas a esta ferramenta é que ela requer grandes volumes de cultura *in vivo* de *Leishmania* spp, e também não identifica a diversidade genética dos parasitas (Lewin *et al.*, 2002).

Atualmente, estão disponíveis outros métodos para a identificação de espécies de *Leishmania*. A PCR e suas variações, além de bastante adequado ao diagnóstico, devido à sua elevada sensibilidade, é igualmente versátil para a identificação de espécies (Cortes *et al.*, 2004). Uma das vantagens da PCR é que ela permite a detecção do DNA do parasito numa variedade enorme de tecidos, incluindo a medula óssea, gânglios linfáticos, pele, sangue, além da utilização de pequenas quantidades da amostra biológica para a extração de DNA (Maia *et al.*, 2007, Silva *et al.*, 2010). Isto representa mais rapidez para geração de resultados, menor custo com mão de obra técnica e maior aceitação pelo paciente. Nos últimos anos, vários iniciadores - *primers* específicos para o DNA de *Leishmania* foram utilizados em PCR (Ashford *et al.*, 1995, Pirmez *et al.*, 1999, da Silva *et al.*, 2010, Graça *et al.*, 2012). Todavia, apesar desta metodologia se mostrar bastante promissora, muitos alvos (*primers*) utilizados nestas abordagens apresentam uma considerável heterogeneidade, o que pode acarretar em perda de acurácia do ensaio, dificultando assim o uso na prática clínica.

O crescente número de dados de sequenciamento de DNA sendo depositados em bancos públicos e os avanços na bioinformática permitiram a identificação de vários loci de microssatélites, pequenas sequências repetidas em tandem consistindo de unidades de 1-6 nucleotídeos flanqueadas por sequências conservadas (Tóth *et al.*, 2000). O MLMT (*Multilocus microsatellite typing*) é uma ferramenta promissora para estudos taxonômicos, epidemiológicos e de genética populacional, que pode ser usado

diretamente em material biológico, sem cultivo do parasito. O poder discriminatório do MLMT é maior do que outros marcadores genéticos utilizados para caracterização da *Leishmania* (Kuhls *et al.*, 2007). Todavia, a realização de mais estudos se faz necessário a fim de validar este método como uma ferramenta molecular epidemiológica.

Diante de tantos avanços, o método do MLEE ainda continua sendo o mais recomendado para a tipagem das espécies de *Leishmania*. Assim, em nosso trabalho, os isolados inclusos no estudo foram caracterizados por isoenzimas no Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de *Leishmania* - IOC/Fiocruz (Artigo 1 e Manuscrito 1).

Além da metodologia empregada, mudanças ambientais na região podem ter contribuído para o aumento do número de casos de LC causado por *L. naiffi*. O desmatamento, esgotamento de recursos naturais, construção de estradas e urbanização podem colaborar para a alteração ou perda dos habitats naturais dos vetores e dos hospedeiros de *L. naiffi*. Com isso, a infecção pode se dar num ambiente peridomiciliar ou até mesmo domiciliar, inserindo cada vez mais o homem no ciclo da doença.

Comenta-se com frequência que o tratamento da LTA no Estado do Amazonas se constitui um desafio à saúde pública devido a diversos fatores, dentre eles: a dificuldade de acesso às regiões florestais, os efeitos adversos do medicamento, e principalmente ao alto índice de falha terapêutica associada às drogas leishmanicidas. Até o momento, o insucesso terapêutico no entorno de Manaus tinha sido bem descrito nas infecções por *L. guyanensis* e *L. braziliensis* (Neves *et al.*, 2011). Até onde é de nosso conhecimento, o presente estudo foi o primeiro a publicar a ocorrência de dois casos de falha terapêutica também em *L. naiffi*, dentre oito casos identificados. Após o diagnóstico, estes pacientes foram tratados com antimonial e pentamidina sequencialmente, mas não evoluíram com cura clínica, sendo necessário um novo ciclo de tratamento (Artigo 1). Da mesma forma, em um caso clínico descrito pelo grupo (Manuscrito 1) também foi observado a falha terapêutica de um paciente que se infectou na Amazônia por *L. naiffi*.

O fenômeno de falha terapêutica é complexo, uma vez que há vários fatores envolvidos: características do hospedeiro, a genética e a resposta imunológica; fatores farmacológicos; a duração do tratamento; e a biologia do parasito, como uma insensibilidade intrínseca de uma determinada espécie ou cepa e o fenótipo de

resistência à droga (Grogl *et al.*, 1989). Recentemente, o interesse pela co-infecção de *Leishmania* com o *Leishmania* RNA vírus (LRV) foi reavivado por Ives e colaboradores (2011), apesar desta associação já ter sido descrita desde os anos 80 (Taar *et al.*, 1988, Widmer *et al.*, 1989). Neste trabalho foi descrito que a presença do LRV na *L.guyanensis* favorece a expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias após o reconhecimento via receptor Toll-Like 3 (TLR3) (Ives *et al.*, 2011). Apesar de não ter sido analisado pacientes com leishmaniose mucosa (LM), estes resultados levaram os autores a sugerirem que a indução exacerbada da resposta imune devido à presença do LRV poderia aumentar o dano tecidual, predispondo a evolução para formas mucosas. Por outro lado, Pereira e colaboradores (2013) não observaram uma associação entre a presença do LRV1 e a gravidade da doença causada por *L. braziliensis*, indicando que o papel deste vírus na LTA ainda precisa ser mais bem elucidado.

Em uma revisão da literatura publicada em 2012, foi sugerido que a presença do vírus na *Leishmania* poderia contribuir para a diminuição da eficácia da droga anti-leishmanicida (Hartley *et al.*, 2012). Recentemente foi observada uma associação entre o LRV1 e a falha terapêutica tanto para a espécie *L. braziliensis* como para a *L. guyanensis* (Adui *et al.*, 2015, Borreau *et al.*, 2015), indicando que além da modulação da resposta imune, o vírus pode reduzir o efeito da droga utilizada no tratamento.

Em virtude do que foi mencionado, a presença do LRV em uma espécie considerada benigna pode ter contribuído para o desenvolvimento de uma má resposta ao tratamento, conforme descrito nesta tese (Manuscrito 1). No entanto, estudos posteriores precisam ser realizados a fim de confirmar o papel do LRV na *Leishmania*, fundamentalmente na *L. naiffi*.

CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 2

✓ O presente trabalho descreveu uma elevada frequência de casos de *L. naiffi* dentre as amostras avaliadas, indicando que esta espécie pode não ser tão rara como descrito e pode estar se expandindo na região da Grande Manaus.

✓ A *L. naiffi* pode não apresentar um caráter benigno como relatado na maioria dos estudos, visto que foi observada uma associação entre esta espécie e o insucesso terapêutico.

✓ A presença do LRV na *L. naiffi* pode ter contribuído para o desenvolvimento da má resposta terapêutica a pentamidina.

CONCLUSÕES GERAIS

✓ A redução dos níveis de IgG1 ou IgG3 anti-*Leishmania* pode ser um critério laboratorial de cura clínica da leishmaniose tegumentar Americana que pode ser utilizado como ferramenta para auxiliar da prática clínica.

✓ Os indivíduos LC curados há longo tempo mantém uma resposta duradoura fundamentada na ativação de células T de memória efetora e central sem renovação destes compartimentos sob o estímulo com antígenos de *L. braziliensis*, perfil este que deve ser importante para a estabilidade e manutenção da cura destes pacientes.

✓ A frequência de *L. naiffi* entre os isolados de leishmaniose cutânea avaliados foi de 26,7%, indicando que esta espécie pode ser um agente etiológico mais frequente do que é relatado na região da Grande Manaus.

✓ O presente trabalho foi o primeiro a observar a associação entre a falha terapêutica e *L. naiffi* em pacientes de leishmaniose cutânea provenientes da região Amazônica.

✓ A presença do *Leishmania* RNA vírus em um caso clínico de infecção por *L. naiffi* pode ter contribuído para o desenvolvimento de uma má resposta terapêutica.

CAPÍTULO 3

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7: e35671,1-12.
- Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.
- MS/SVS. 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2010. Acessado em julho de 2015. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf
- Da-Cruz AM, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho Z, Machado ES, Coutinho SG 2000. Cellular immune responses to *Leishmania braziliensis* in patients with AIDS-associated American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 569-571.
- Fernández OL, Diaz-Toro Y, Ovalle C, Valderrama L, Muvdi S, Rodríguez I, Gomez MA, Saravia NG 2014. Miltefosine and antimonial drug susceptibility of *Leishmania Viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2871,1-11.
- Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Leishmaniose - Notificações Registradas: banco de dados. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> Acesso em: julho de 2015.
- Figueira Lde P, Zanotti M, Pinheiro FG, Franco AM, 2008. Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 512-514.
- Figueira LP, Soares FV, Naiffi MF, Simas SS, Espir TT, Pinheiro FG, Franco A 2014. Distribuição de casos de leishmaniose tegumentar no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Rev Patol Trop* 43: 173-181.

- Souza WJ, Sabroza PC, Santos CS, de Sousa E, Henrique MF, Coutinho SG 1992. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Trop* 52: 111-119.
- de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, Gonçalves-Costa SC, Brahin LR, Menezes CR, Pirmez C 2000. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol* 39: 506-514.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CE 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 239-251.
- Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM 2007. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 625-630.
- Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM 2012. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg* 86: 426-433.
- Guerra JA, Maciel MG, Guerra MV, Talhari AC, Prestes SR, Fernandes MA, Da-Cruz AM, Martins A, Coelho LI, Romero GA, Barbosa Md 2015. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need? *Rev Soc Bras Med Trop* 48 Suppl 1:12-19.
- Marsden PD, Tada MS, Barreto AC, Cuba CC 1984. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 561-562.
- Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H 1995. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53: 273-277.

- Oliveira-Neto MP, Mattos M, Souza CS, Fernandes O, Pirmez C 1998. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 37: 846-849.
- Gontijo B, Carvalho MLR 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. 36: 71-80.
- Marsden PD 1986. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 859-876.
- Llanos Cuentas EA, Cuba CC, Barreto AC, Marsden PD 1984. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 845-846.
- Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC 2008. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop* 105: 1-9.
- Pessoa SB & Barreto MP 1948. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional/São Paulo: Serviço de Parasitologia, Departamento de Medicina, Faculdade de São Paulo.
- Zajtchuk JT, Casler JD, Netto EM, Grogl M, Neafie RC, Hessel CR, de Magalhaes AV, Marsden PD 1989. Mucosal leishmaniasis in Brazil. *Laryngoscope* 99: 925-939.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7: 581-596.
- Amato VS, Tuon FF, Imamura R, Abegão de Camargo R, Duarte MI, Neto VA 2009. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23: 1026-1034.
- Arevalo J, Ramirez L, Adai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, De Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A 2007. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis* 195: 1846-1851.
- Oliveira Neto MP, Schubach A, Araujo ML, Pirmez C 1996. High and low doses of antimony (Sbv) in American cutaneous leishmaniasis. A five years follow-up study of 15 patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 207-209.

- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C 1997. Treatment of American cutaneous leishmaniasis: a comparison between low dosage (5 mg/kg/day) and high dosage (20 mg/kg/day) antimony regimens. *Pathol Biol* 45: 496-499.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, da Costa SC, Pirmez C 1997. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil - an area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. *Int J Dermatol* 36: 463-468.
- Vasconcellos Ede C, Pimentel MI, Schubach A de O, de Oliveira R de V, Azeredo-Coutinho RB, Silva F da C, Salgueiro M de M, Moreira JS, Madeira M de F, Baptista C, Valete-Rosalino CM 2012. Intralesional meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis patients with contraindication to systemic therapy from Rio de Janeiro (2000 to 2006). *Am J Trop Med Hyg* 87: 257-260.
- Vieira-Gonçalves R, Nogueira RS, Heringer JF, Mendes-Aguiar CO, Gomes-Silva A, Santos-Oliveira JR, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM 2015. Clinical and immunological evidence that low doses of pentavalent antimonials are effective in maintaining long-term cure of *Leishmania (Viannia) braziliensis* cutaneous lesions. *Br J Dermatol*
- Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degrave W, Pirmez C, Grimaldi Jr G, Fernandes O 1998. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis* 178: 1-4.
- Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL, Pacheco RS, Momen H, Conceicao-Silva F, Coutinho SG, Marzochi KB 1998. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg* 58: 824-827.
- Mendonça MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG 2004. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 189: 1018-1023.
- Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM 2002. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis* 34: E54-8.

- Locksley RM, Heinzel FP, Holaday BJ, Mutha SS, Reiner SL, Sadick MD 1991. Induction of Th1 and Th2 CD4+ subsets during murine *Leishmania major* infection. *Res Immunol* 142:28-32.
- Scott P 1991. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 147: 3149-3155.
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169: 59-72.
- Melby PC, Tabares A, Restrepo BI, Cardona AE, McGuff HS, Teale JM 2001. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol* 99: 17-25.
- Gomes-Silva A, de Cássia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM 2007. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* 149: 440-444.
- Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91: 1390-1395.
- Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-6740.
- Amato VS, de Andrade HF, Duarte MI 2003. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop* 85: 39-49.
- Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SC, Coutinho SG 1996. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 225-229.
- Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO 2005. Decreased in situ

expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 73: 7853-7859.

Santos Cda S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, Costa J, Borges VM, de Oliveira CI, Van Weyenbergh J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI 2013. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 133: 1533-1540.

Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM, Reed SG 1995. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 17: 21-28.

Brodskyn CI, Barral A, Boaventura V, Carvalho E, Barral-Netto M 1997. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 159: 4467-4473.

Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG 1994. *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 62: 2614-2618.

Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG 2002. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 251-256.

Brelaz-de-Castro MC, de Almeida AF, de Oliveira AP, de Assis-Souza M, da Rocha LF, Pereira VR 2012. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell Immunol* 279: 180-186.

Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH 2003. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 155-174.

Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, Mori A 2005. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. *Int Arch Allergy Immunol Suppl* 1:51-4.

- Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, Scott P, Carvalho EM 2009. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 200: 75-78.
- Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarêncio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Brodskyn CI, Barral A 2010. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur Immunol* 40:2830-2836.
- Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessen H, Prata A, Dessen A, Rodrigues V 2009. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol* 70: 383-390
- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL 2001. 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* 194: 1497-1506.
- Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjyo I, Ishibashi T, Yoshimura A, Yoshida H 2006. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4⁺ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4⁺ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol* 177: 5377-5385.
- Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162: 5317-5326.
- Read S, Malmström V, Powrie F 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192: 295-302.
- O'Garra A, Vieira P 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 10: 801-805.
- Beissert S, Schwarz A, Schwarz T 2006. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol* 126: 15-24.

- Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 174: 7147-7153.
- Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, Goncalves HS, Belkaid Y, Barral-Netto M, Barral A, Silva JS 2006. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis* 193: 1313-1322.
- Carneiro FP, De Magalhães AV, De Jesus Abreu Almeida Couto M, Bocca AL, Muniz-Junqueira MI, Ribeiro Sampaio RN 2009. Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 646-651.
- Costa DL, Guimarães LH, Cardoso TM, Queiroz A, Lago E, Roselino AM, Bacellar O, Carvalho EM, Silva JS 2013. Characterization of regulatory T cell (Treg) function in patients infected with *Leishmania braziliensis*. *Hum Immunol* 74: 1491-1500.
- de Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC, Marsden PD 1986. [Histopathology of tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 3. Cellular reactions in tissues]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 28: 300-311.
- Pleass RJ & Woof JM 2001. Fc receptors and immunity to parasites. *Trends in Parasitology* 17: 545-551.
- Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SMB, Mosser DM 2005. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *Journal of Experimental Medicine* 201:747-754.
- Buxbaum LU 2008. A detrimental role for IgG and FcγR in *Leishmania mexicana* infection. *Immunol Res* 42: 197-209.
- den Haan JM, Bevan MJ 2002. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 196: 817-827
- Brito MEF, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FGC 2001. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 203-220.

- Fagundes-Silva GA, Vieira-Goncalves R, Nepomuceno MP, de Souza MA, Favoreto S Jr, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A 2012. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol* 34: 486-491.
- Junqueira Pedras M, Orsini M, Castro M, Passos VMA, Rabelo A 2003. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47: 477-485.
- Trowbridge IS, Thomas ML 1994. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12:85-116.
- Smith SH, Brown MH, Rowe D, Callard RE, Beverley PCL 1986. Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new mAb, UCHL1. *Immunology* 58: 63-70.
- Sanders ME, Makgoba MW, Sharrow SO, Stephany D, Springer TA, Young HA, Shaw S 1988. Human memory T lymphocytes express increased levels of three cells adhesion molecules (LFA-3, CD2 and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29 and Pgp-1) and have enhanced IFN- γ production. *J. Immunol* 140: 1401-1407.
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401: 708-712.
- Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW 2003. Memory T cells and vaccines. *Vaccine* 21: 419-430.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-63.
- Scott P 2005. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol* 7: 1707-1713.
- Zinkernagel RM 2003. On natural and artificial vaccinations. *Annu Rev Immunol* 21: 515-546.
- Zaph C, Uzonna J, Beverley S, Scott P 2004. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat Med* 10:1104-1110.

- Gollob KJ, Antonelli LR, Dutra WO 2005. Insights into CD4+ memory T cells following *Leishmania* infection. *Trends Parasitol* 21: 347-350.
- Gollob KJ, Antonelli LR, Faria DR, Keesen TS, Dutra WO 2008. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int Immunopharmacol* 8: 1338-1343.
- Carvalho AM, Magalhães A, Carvalho LP, Bacellar O, Scott P, Carvalho EM 2013. Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 13: 1-8.
- Pereira-Carvalho R, Mendes-Aguiar CO, Oliveira-Neto MP, Covas CJ, Bertho AL, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A 2013. *Leishmania braziliensis*-reactive T cells are down-regulated in long-term cured cutaneous Leishmaniasis, but the renewal capacity of T effector memory compartments is preserved. *PLoS One* 8:e81529, 1-8.
- Trujillo C, Ramírez R, Vélez ID, Berberich C 1999. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett* 70: 203-209.
- Romero GA, de la Glória Orge Orge M, de Farias Guerra MV, Paes MG, de Oliveira Macêdo V, de Carvalho EM 2005. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop* 93: 49-56.
- Delgado O, Guevara P, Silva S, Belfort E, Ramirez JL 1996. Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* using conventional immunologic techniques and polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 55: 267-272.
- Junqueira-Pedras M, Orsini M, Castro M, Passos VMA, Rabelo A 2003. Antibody subclasse profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47: 477-485.

- WHO. Control of Leishmaniasis: report of a WHO Expert Committee, Geneva, 1990. WHO technical report series, no. 793.
- Gomes-Silva A, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Andrade LR, Dietze R, Lemos E, Belli A, Favoreto Júnior S, Ferreira MS 2008. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 135-141.
- Pissinate JF, Gomes IT, Peruhype-Magalhães V, Dietze R, Martins-Filho OA, Lemos EM. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *J Immunol Methods* 336: 193-202.
- De Souza MA, da Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto SJ, Ferreira MS 2005. Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in American tegumentary leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 38:137-141.
- Barroso-Freitas AP, Passos SR, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GP, Nascimento LD, Marzochi MC, Marzochi KB 2009. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 383-389.
- Gomes IT, Carvalho SF, Rocha RD, Peruhype-Magalhães V, Dietze R, Martins-Filho OA, Lemos EM 2010. Anti-*Leishmania chagasi* immunoglobulin G3 detected by flow cytometry for early cure assessment in American visceral leishmaniasis. *J Immunol Methods* 360: 76-83.
- de Assis Souza M, de Castro MC, de Oliveira AP, de Almeida AF, de Almeida TM, Reis LC, Medeiros ÂC, de Brito ME, Pereira VR 2013. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microb Pathog* 57: 27-32.
- Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJ, Oliveira MP, Rutowitsch MS, Da-Cruz AM 2008. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int J Dermatol* 47: 926-932.

- Keshavarz Valian H, Nateghi Rostami M, Tasbihi M, Miramin Mohammadi A, Eskandari SE, Sarrafnejad A, Khamesipour A 2013. CCR7+ central and CCR7- effector memory CD4+ T cells in human cutaneous leishmaniasis. *J Clin Immunol* 33: 220-234.
- Gutierrez Y, Salinas GH, Palma G, Valderraa LB, Santrich CV, Saravia NG 1991. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg* 45: 281-289.
- [Mucocutaneous leishmaniasis in Brazilian Amazonia]. Camuset G, Remy V, Hansmann Y, Christmann D, Gomes de Albuquerque C, Sena Casseb GA 2007. *Med Mal Infect* 37: 343-346.
- Okwor I, Uzonna J 2008. Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies. *Immunol Res* 41: 123-136.
- Esquenazi DA 2008. Imunosenescência: As Alterações do Sistema Imunológico provocadas pelo Envelhecimento. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto* (Online) 7: 38-45.
- Su H, Feilzer K, Caldwell HD, Morrison RP 1997. *Chlamydia trachomatis* genital tract infection of antibody-deficient gene knockout mice. *Infect Immun* 65: 1993-1999.
- Mastroeni P, Simmons C, Fowler R, Hormaeche CE, Dougan G 2000. Igh-6(-/-) (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium and show impaired Th1 T-cell responses to *Salmonella* antigens. *Infect Immun* 68: 46-53.
- Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, Waisman A, Nigg AP, Knop J, Udey MC, von Stebut E 2006. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med* 203: 177-188.
- Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM 2009. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* 10: 385-393.
- Mendonça SC, Souza WJ, Nunes MP, Marzochi MC, Coutinho SG 1988. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 347-355.

- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EAY 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the ecoepidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 435-443.
- Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AA, Lainson R 2002. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania(Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite* 9:43-50.
- Grimaldi G Jr, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D 1991. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 44: 645-661.
- Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO 2001. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 65: 456–465.
- Romero GA, Ishikawa E, Cupolillo E, Toaldo CB, Guerra MV, Paes GM, Macêdo VO, Shaw JJ 2002. Identification of antigenically distinct populations of *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. *Acta Trop* 82: 25–29.
- Pajot FX, Le Pont F, Gentile B, Besnard R 1982. Epidemiology of leishmaniasis in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76: 112-113.
- Arias JR, Naif RD, Miles MA, de Souza AA 1981. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 537-541.
- Lainson R 1983. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 569-596.
- Barret, TV, Senra MS 1989. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. *Parasitology Today* 8: 255-257.
- Andrade SL 1997. Leishmaniose tegumentar americana em área de ocupação recente na periferia da Cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz.

- Neves LO, Talhari AC, Gadelha EP, Silva Júnior RM, Guerra JA, Ferreira LC, Talhari S 2011. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol* 86: 1092-2010.
- Matta NE, Nogueira RS, Franco AM, de Souza E Souza I, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Leon LL, Da-Cruz AM 2009. *Leishmania (Viannia) guyanensis* induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon Highland. *Am J Trop Med Hyg* 80: 339-344.
- Bourreau E, Prévot G, Pradinaud R, Launois P 2001. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive to IL-12. *J Infect Dis* 15: 953-959.
- Bourreau E, Gardon J, Pradinaud R, Pascalis H, Prévot-Linguet G, Karimnia A, Pascal L 2003. Th2 responses predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and precede the development of Th1 responses. *Infect Immun* 71: 2244-2246.
- Tarr PI, Aline RF Jr, Smiley BL, Scholler J, Keithly J, Stuart K, 1988. LR1: a candidate RNA virus of *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9572-9575.
- Widmer G, Comeau AM, Furlong DB, Wirth DF, Patterson JL 1989. Characterization of a RNA virus from the parasite *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5979-5982.
- Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, Zangger H, Revaz-Breton M, Lye LF, Hickerson SM, Beverley SM, Acha-Orbea H, Launois P, Fasel N, Masina S 2011. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science* 331: 775-778.
- Pereira L de O, Maretti-Mira AC, Rodrigues KM, Lima RB, Oliveira-Neto MP, Cupolillo E, Pirmez C 2013. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania* RNA virus 1 infection in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 665-667.
- Adaui V, Lye LF, Akopyants NS, Zimic M, Llanos-Cuentas A, Garcia L, Maes I, De Doncker S, Dobson DE, Arevalo J, Dujardin JC, Beverley SM 2015. Association of the endobiont doubled-stranded RNA virus LRV1 with treatment failure of human

- leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. *J Infect Dis* pii: jiv354.
- Bourreau E, Ginouves M, Prévot G, Hartley MA, Gangneux JP, Robert-Gangneux F, Dufour J, Marie DS, Bertolotti A, Pratlong F, Martin R, Schütz F, Couppié P, Fasel N, Ronet C 2015. *Leishmania*-RNA virus presence in *L. guyanensis* parasites increases the risk of first-line treatment failure and symptomatic relapse. *J Infect Dis* pii: jiv355.
- Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa MD, Ferreira LC 2011. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *Plos Negl Trop Dis* 8:e980.
- Lainson R 1985. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon region of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18: 47-56.
- Costa JML, Cunha AK, Gama MEA, Saldanha ACR 1998. Leishmaniose cutânea difusa: revisão. *An Bras Derm* 73: 565–576.
- Andrade ASR, Gomes RF, Fernandes O, Fontes CJ, Melo MN 1999. Typing of *Leishmania* from human sample from Mato Grosso State by DNA hybridization. In: Resumos do XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, Poços de Caldas, MG p. 43.
- Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ, Ishikawa EAY, Carvalho-Pinto CJ, Mangrich IE, Toma HK, Lima JH, Romanha AJ, Campbell DA 2000. Characterization of *Leishmania* sp strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. *Acta Tropica* 74: 89-93.
- Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, Pacheco RS, Valete-Rosalino CM, Mendonça SC 2007. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 735-7
- Rebêlo JM, de Araújo JA, Carvalho ML, Barros VL, Silva FS, de Oliveira ST 1999. [Phlebotomus (Diptera, Phlebotominae) from Saint Luis Island, Maranhão Gulf region, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 247-253.

- Moraes MAP, Silveira FT 1994. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 36: 459-463.
- Silveira FT 2009. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Gazeta Médica da Bahia* 79 (Supl.3): 25-29.
- Ulrich M, Rodriguez V, Centeno M, Convit J 1995. Differing antibody IgG isotypes in the polar forms of leprosy and cutaneous leishmaniasis characterized by antigen-specific T cell anergy. *Clin Exp Immunol* 100: 54-58.
- Petersen EA, Neva FA, Oster CN, Bogaert Diaz H 1982. Specific inhibition of lymphocyte-proliferation responses by adherent suppressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med* 306: 387-392.
- Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM 1995. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol* 34: 474-479.
- Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C 2002. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 70: 4638-4642.
- Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A 1996. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 84: 188-194.
- Pubmed, NCBI - Centro Nacional para a Informação Biotecnológica. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Leishmania+naiffi>> Acesso em: 09 de agosto de 2015.
- Lainson R, Shaw JJ 1989. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasyus novemcinctus (L.)* in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp* 64:3-9.
- Naiff RD, Freitas RA, Naiff MF, Arias JR, Barrett TV, Momen H, Grimaldi Júnior G 1991. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw 1989. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 317-321.
- Felinto de Brito ME, Andrade MS, de Almeida EL, Medeiros AC, Werkhäuser RP, de Araújo AI, Brandão-Filho SP, Paiva de Almeida AM, Gomes Rodrigues EH 2012.

- Occupationally acquired american cutaneous leishmaniasis. *Case Rep Dermatol Med* 2012: 279517.
- Pratlong F, Deniau M, Darie H, Eichenlaub S, Pröll S, Garrabe E, le Guyadec T, Dedet JP 2002. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania naiffi* is wide-spread in South America. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 781-785.
- van der Snoek EM, Lammers AM, Kortbeek LM, Roelfsema JH, Bart A, Jaspers CA 2009. Spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania naiffi* in two Dutch infantry soldiers. *Clin Exp Dermatol* 34: e889-91.
- Kato H, Gomez EA, Yamamoto Y, Calvopiña M, Guevara AG, Marco JD, Barroso PA, Iwata H, Hashiguchi Y 2008. Natural infection of *Lutzomyia tortura* with *Leishmania (Viannia) naiffi* in an Amazonian area of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 79: 438-440.
- Campos MB, De Castro Gomes CM, de Souza AA, Lainson R, Corbett CE, Silveira FT 2008. *In vitro* infectivity of species of *Leishmania (Viannia)* responsible for American cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Res* 103: 771-776.
- Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Leishmaniose- Notificações Registradas: banco de dados. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> Acesso em: 26 de fevereiro de 2015.
- Naiff RD, Talhari S, Barret TV 1988. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 529-530.
- Guerra JAO, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM 2003. Clinical and diagnostic aspects of American tegumentary leishmaniasis in soldiers simultaneously exposed to the infection in the Amazon Region. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 587-590.
- Romero GA, Ishikawa E, Cupolillo E, Toaldo CB, Guerra MV, Paes MG, Macêdo VO, Shaw JJ 2002. The rarity of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, who have cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 131-136.
- Tojal da Silva AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GA 2006. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health* 11: 1388-1398.

- Jennings YL, de Souza AA, Ishikawa EA, Shaw J, Lainson R, Silveira F 2014. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania (Viannia) guyanensis* × *Leishmania (Viannia) shawi shawi*. *Parasite* 21:39.
- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H, 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxinomy. *Am J Trop Med Hyg* 50: 296-311.
- Degrave W, Fernandes O, Thiemann O, Wincker P, Britto C, Cardoso A, Pereira JB, Bozza M, Lopes U, Morel C 1994. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* using the polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 367-368.
- Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Cupolillo E, Bentin Toaldo C, Macedo VO, Fernandes O 2001. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *Acta Trop* 79: 225-229.
- Camara Coelho LI, Paes M, Guerra JA, Barbosa MD, Coelho C, Lima B, Brito ME, Brandão Filho SP, 2011. Characterization of *Leishmania* spp. Causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res* 108: 671-677.
- Arevalo J, Ramirez L, Adai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, De Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A 2007. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis* 195: 1846-1851.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 11: 4673-4680.
- Panamerican Health Organization, 1997. Cooperation of the Pan American Health Organization in the Health Sector Reform Processes. Washington, DC: PAHO
- Control of the leishmaniasis, 1990. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 793:1-158.
- Stuart KD, Weeks R, Guilbride L, Myler PJ, 1992. Molecular organization of *Leishmania* RNA virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 15: 8596-600.

- Salinas G, Zamora M, Stuart K, Saravia N, 1996. *Leishmania* RNA viruses in *Leishmania* of the *Viannia* subgenus. *Am J Trop Med Hyg* 54: 425-429.
- Hartley MA, Ronet C, Zangger H, Beverley SM, Fasel N, 2012. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. *Front Cell Infect Microbiol* 2:99.
- Scheffer SM, Ro YT, Chung IK, Petterson JL 1995. The complete sequence of *Leishmania* RNA virus LRV2-1, a virus of an Old World parasite strain. *Virology* 212212: 84-90.
- Gramiccia M, Smith DF, Angelici MC, Ready PD, Gradoni L 1992. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. *Parasitology* 105: 29-34.
- Kallel K, Pratlong F, Haouas N, Kaouech E, Belhadj S, Anane S, Dedet JP, Babba H, Chaker E 2001. Isoenzymatic variability of *Leishmania infantum* in Tunisia concerning 254 human strains. *Acta Trop* 106: 132-136.
- Martín-Sánchez J, Pineda JA, Morillas-Márquez F, García-García JA, Acedo C, Macías J 2004. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. *Am J Trop Med Hyg* 70: 545-548.
- Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 12-17.
- Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulalio C, Lopes U, Fernandes O, Degraive W, Barker RH Jr, Badaro R, David JR 1995. Comparison of the Polymerase Chain Reaction and Serology for the Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 199553: 251-255.
- Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, Degraive W, Fernandes O 1999. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 37: 1819-1823.
- Graça GC, Volpini AC, Romero GA, Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, Boité MC, Cupolillo E 2012. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis

- of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 664-674.
- da Silva RN, Amorim AC, Brandão RM, de Andrade HM, Yokoo M, Ribeiro ML, Bartchewsky W, Socorro-Silva A, de Castro JA, do Monte SJ. Real-time PCR in clinical practice: a powerful tool for evaluating *Leishmania chagasi* loads in naturally infected dogs. *Ann Trop Med Parasitol* 104: 137-143.
- Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 179: 142-144.
- da Silva LA, de Sousa Cdos S, da Graça GC, Porrozzi R, Cupolillo E 2010. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol* 10: 77-83.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res* 10: 967-981.
- Kuhls K, Keilonat L, Ochsenreither S, Schaar M, Schweynoch C, Presber W, Schönian G 2007. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes Infect* 9: 334-343.
- Grögl M, Oduola AM, Cordero LD, Kyle DE 1989. *Leishmania* spp.: development of pentostam-resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. *Exp Parasitol* 69: 78.