

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA <sup>1</sup>***Andresa Pereira de Oliveira*

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma infecção parasitária, cujo agente etiológico de maior incidência no Brasil é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Em todas as formas clínicas da doença, sabe-se que a resposta imune é dependente de células T. Embora estudos avaliem a resposta humoral na LTA, ainda não está esclarecido o papel de anticorpos específicos na imunidade contra *Leishmania*. Além disso, existem dificuldades no diagnóstico da LTA, pois é realizado por associações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais. Considerando os benefícios da citometria de fluxo, uma nova abordagem utilizada na pesquisa de anticorpos com aplicabilidade superior aos diferentes protocolos de detecção e revelação convencionais, este estudo apresenta uma alternativa por meio da pesquisa de anticorpos IgG de *L (V) braziliensis*, aplicável ao diagnóstico da LTA e ao critério de cura. Este estudo teve como objetivos comparar as técnicas de reação de imunofluorescência indireta (IFI) e citometria de fluxo na avaliação clínico-laboratorial dos pacientes antes e após cura clínica e avaliar a aplicabilidade da citometria de fluxo no monitoramento pós-terapêutico dos pacientes. Soros de 14 pacientes antes do tratamento (AT), 13 pacientes um ano após o tratamento (PT), 10 pacientes com dois e cinco anos PT foram analisados e os resultados foram expressos em níveis de reatividade de IgG com base na porcentagem de parasitos fluorescentes positivos (PPFP). A diluição 1:256 das amostras permitiu diferenciar os indivíduos AT e PT. A análise comparativa da IFI e da citometria de fluxo pela curva Receiver Operating Characteristic Curve (ROC) demonstrou área sob a curva (ASC) de =0,78 (IC<sub>95%</sub> = 0,64-0,89) e ASC=0,90 (IC<sub>95%</sub> = 0,75-0,95), respectivamente, configurando elevada acurácia do teste de citometria de fluxo. Nossos dados demonstram que 20% foi o melhor ponto de corte identificado pela curva ROC para o ensaio de citometria de fluxo. Este ensaio apresentou sensibilidade de 86% e especificidade de 77%, enquanto a IFI apresentou sensibilidade de 71% e especificidade de 69%. O monitoramento pós-terapêutico, por meio da análise comparativa dos índices de desempenho das técnicas em um, dois e cinco anos PT,

---

1 Resumo de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, sob orientação da Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica, Recife, Pernambuco, Brasil, 2011.

Endereço para correspondência: Andressa Pereira de Oliveira, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brasil. E-mail: andresadeolinda@gmail.com ou valeriaph@gmail.com.

revelou melhor desempenho da citometria de fluxo que da IFI. Portanto, a citometria de fluxo demonstrou ser uma alternativa diagnóstica aplicável ao estudo da LTA e as informações obtidas neste trabalho abrem perspectivas para o monitoramento de cura pós-terapêutica da LTA.

## FLOW CYTOMETRY APPLICATION ON THE DIAGNOSIS OF THE AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a parasitic infection which has *Leishmania (Viannia) braziliensis* as the etiologic agent of highest incidence in Brazil. In all forms of the disease, it is known that the immune response is dependent on T cells. Although studies assessing the humoral immune response in ATL are not yet clarified, the role of antibodies in immunity against *Leishmania* has been recognized. Moreover, the diagnosis of ATL presents difficulties since it is performed by the associations of clinical, epidemiological, and laboratory findings. Considering the applicability of flow cytometry, a new approach used in the detection of antibodies with superior applicability to different protocols of conventional detection and revelation, this study provides the alternative of detecting *L (V) braziliensis* IgG antibodies for ATL diagnosis and cure criterion. The aim of this study was to compare the indirect immunofluorescence assay (IFA) and flow cytometry techniques to clinical and laboratory evaluation of patients before and after clinical cure and to evaluate the use of flow cytometry in post-therapeutic monitoring of patients. Sera from 14 patients before treatment (BT), 13 patients 1 year after treatment (AT), and 10 patients 2 and 5 years AT were analyzed. The results were expressed as levels of IgG reactivity, based on the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP). The 1:256 samples dilutions allowed differentiating between individuals BT and AT. Comparative analysis of IFA and flow cytometry by ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) showed, respectively, AUC (area under curve) = 0.78 (95% CI = 0.64-0.89) and AUC = 0.90 (95% CI = 0.75-0.95), demonstrating that the flow cytometry has a higher accuracy. Our data demonstrated that 20% was the best cut-off point identified by the ROC curve for the flow cytometry assay. This test showed a sensitivity of 86% and specificity of 77% while the IFA had a sensitivity of 71% and specificity of 69%. After treatment monitoring was obtained through comparative analysis of the techniques performance indexes in 1, 2 and 5 years AT. This analysis showed a better performance for flow cytometry in relation to IFI. Therefore, flow cytometry showed to be a better diagnostic alternative when applied to the study of ATL. In addition, the information obtained in this study opens perspectives to monitor cure after treatment of ATL.

# CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA EM LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA<sup>1</sup>

Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença observada em todo o Brasil. Em Pernambuco, é incidente em todas as regiões, sendo a *L. (V.) braziliensis* o agente etiológico de maior prevalência. A LTA pode causar desde lesões cutâneas localizadas até lesões mucocutâneas resultantes da interação parasito-hospedeiro-vetor. A susceptibilidade ou resistência à doença é dependente das respostas de células T, caracterizadas pelo aumento de células T CD4<sup>+</sup>, apresentando um perfil de citocinas Th1 ou Th2. Já os linfócitos T CD8<sup>+</sup> estão relacionados com os mecanismos imunoprotetores na LTA. Neste estudo, os objetivos foram caracterizar imunofenotipicamente os linfócitos T do sangue periférico de 17 pacientes antes do tratamento, 11 após o tratamento e 5 curados espontaneamente e também caracterizar a produção das citocinas IL-10, IL-4, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em culturas de PBMC após estimulação com as frações antigênicas solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis*. Os resultados mostraram que ambas as frações antigênicas foram capazes de induzir uma resposta imune específica. Não ocorreram modificações significativas no perfil fenotípico *ex vivo* das células T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>; entretanto células T CD25<sup>+</sup> mostraram-se significativamente aumentadas. Foi observada imunossupressão temporária na fase inicial da leishmaniose, com presença significativa das citocinas IL-10 e IL-4 e de células T CD4<sup>+</sup>, sugerindo sua ligação com a progressão da doença. Após o tratamento ou a cura espontânea, o padrão imunológico observado indicou a existência de células T de memória com uma resposta do tipo 1, com produção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e presença significativa de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Além disso, a produção significativa de IL-10 nas culturas e o perfil de células T CD25<sup>+</sup> nos ensaios *ex vivo* sugerem a existência de mecanismos de imunorregulação. Sendo assim, esta resposta das células T, após o tratamento ou a cura espontânea, parece estar associada com a cura e/ou a proteção na LTA.

---

1 Resumo de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, sob orientação da Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira para obtenção do título de Mestre em Ciências, Recife, Pernambuco, Brasil, 2011.

Endereço para correspondência: Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro, Laboratório de Imunogenética, depto. de Imunologia do CPqAM/ FIOCRUZ Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP: 50.670-420. E-mail para correspondência: ninaccioly@gmail.com.

## IMMUNOPHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS

The American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a disease observed in all states of Brazil. In Pernambuco, this condition is present in all regions, with *L. (V.) braziliensis* being the prevalent etiologic agent. ATL can cause from localized skin to mucocutaneous lesions, resulting from the host-parasite-vector interactions. The susceptibility or resistance to the disease is dependent on T cell responses, characterized by an increase in the CD4<sup>+</sup> T cells, showing a Th1 or Th2 profile. CD8<sup>+</sup> T cells are related to immunoprotective mechanisms in ATL. The objectives of this study were to characterize immunophenotypically T lymphocytes from peripheral blood from 17 patients before treatment, 11 after treatment and 5 spontaneously cured. Furthermore, to characterize the production of IL-10, IL-4, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  cytokines by PBMC cultures after stimulation with soluble and insoluble antigenic fractions of *L. (V.) braziliensis*. The results showed that both antigenic fractions were able to induce a specific immune response. There were no significant changes in the phenotypic profile of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells *ex vivo*, however CD25<sup>+</sup> T cells were significantly increased. We observed a transitory immunosuppression in the early phase of leishmaniasis, with significant presence of IL-10 and IL-4 and CD4<sup>+</sup> T cells, suggesting their connection with disease progression. After treatment or spontaneous healing, the immune pattern observed indicated the presence of memory T cells, a type 1 response, the production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and the significant presence of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Furthermore, immunoregulatory mechanisms were suggested by the existence of CD25<sup>+</sup> T cells *ex vivo* and by the significant production of IL-10 in cultures. Therefore, this T cell response after treatment or spontaneous healing seems to be associated with cure and / or protection in the ACL.