

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



Instituto Nacional de Infectologia

Evandro Chagas

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA**  
**EVANDRO CHAGAS**  
**MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM**  
**DOENÇAS INFECCIOSAS**

**CARLA DE OLIVEIRA RIBEIRO**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE PACIENTES**  
**COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**  
**AMERICANA COM RESOLUÇÃO ESPONTÂNEA E**  
**AQUELES QUE FORAM SUBMETIDOS A**  
**TRATAMENTO ESPECÍFICO NO INI, FIOCRUZ.**

Rio de Janeiro

2015

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R484 Ribeiro, Carla de Oliveira

Estudo comparativo entre pacientes com leishmaniose tegumentar americana com resolução espontânea e aqueles que foram submetidos a tratamento específico no INI, Fiocruz / Carla de Oliveira Ribeiro. – Rio de Janeiro, 2015.

xv, 100 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2015.

Bibliografia: f. 80-88

1. Leishmaniose cutânea. 2. Cicatrização. 3. Imunologia. 4. Remissão espontânea. I. Título.

CDD 616.9364

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE PACIENTES  
COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA COM RESOLUÇÃO ESPONTÂNEA E  
AQUELES QUE FORAM SUBMETIDOS A  
TRATAMENTO ESPECÍFICO NO INI, FIOCRUZ.**

CARLA DE OLIVEIRA RIBEIRO

Dissertação apresentada ao Curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fátima Conceição Silva

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês Fernandes Pimentel

Rio de Janeiro

2015

CARLA DE OLIVEIRA RIBEIRO

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE PACIENTES COM  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA COM RESOLUÇÃO  
ESPONTÂNEA E AQUELES QUE FORAM SUBMETIDOS A  
TRATAMENTO ESPECÍFICO NO INI, FIOCRUZ.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação de Pesquisa Clínica em Doenças  
Infecciosas do Instituto Nacional de  
Infectologia Evandro Chagas para obtenção  
do grau de Mestre em Ciências

Orientadoras: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Fátima Conceição Silva

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel

Aprovado em / /

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Raquel de Vasconcellos Carvalho de Oliveira (Presidente)

---

Dra. Érica de Camargo Ferreira e Vasconcellos

---

Prof Dr. Antonio Macedo D'Acri

---

Dr. Marcelo Rosandiski Lyra (Suplente)

Dedico esta dissertação aos meus pais por sua dedicação e ao meu esposo Carlos pelo apoio, em todos os momentos....

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que é a fonte de todo o conhecimento.

Ao meu esposo Carlos pela dedicação, amor e companheirismo.

Aos meus familiares pelo apoio cotidiano, em especial aos meus pais, avós e primos Meire, Marcelo, Hugo Júnior e Christianne.

Aos amigos de caminhada, com todo o suporte entre brincadeiras e dissabores. Em especial agradeço a Odete Carvalho, Marcos Abreu e Fernando Almeida, pela amizade devotada.

Às doutoras Raquel de Vasconcellos e Fernanda Morgado, pela paciência constante.

À Jéssica Leite e Aline Renzetti, pelo aprendizado nas técnicas laboratoriais.

A toda equipe do LAPCLIN VIGILEISH, em especial à Liliane de Fatima, Doutora Érica Vasconcellos e Doutor Sandro Bedoya, pelo companheirismo e amizade.

Às secretárias Priscilla Tavares e Rosangela Leite Pelegrino pelo carinho e ajuda constante.

À minha orientadora, Doutora Fátima Conceição Silva pelo suporte necessário, amizade e compreensão, em todos os momentos.

À minha orientadora, Doutora Maria Inês Fernandes Pimentel, por me estender a mão e seu conhecimento sempre com doçura nas palavras e atos.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

*Cora Coralina*

Ribeiro, C. de O. **Estudo comparativo entre pacientes com leishmaniose tegumentar americana com resolução espontânea e aqueles que foram submetidos a tratamento específico no INI, Fiocruz.** Rio de Janeiro, 2015. 115 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

## RESUMO

A resolução espontânea precoce de lesão em leishmaniose tegumentar americana é ainda pouco compreendida e pode se relacionar à espécie de *Leishmania* e às características da resposta imune do hospedeiro. Objetivou-se comparar dados clínico-laboratoriais e perfil de resposta imune *in situ* entre pacientes que necessitaram de tratamento específico (LC) e aqueles que evoluíram para resolução espontânea, sem necessidade de tratamento (LRE). Foram estudados 13 (2,9%) casos LRE e 432 pacientes LC. Compararam-se dados clínicos e laboratoriais durante a investigação diagnóstica. Posteriormente, 12 pacientes LRE com fragmentos histológicos criopreservados foram pareados (por sexo, idade e localização de lesão) com 24 pacientes LC, para estudo imunohistoquímico. O grupo LRE apresentou mais: lesão única ( $p=0,027$ ); aspecto cicatricial ao exame inicial ( $p=0,001$ ); lesão localizada em tronco posterior ( $p=0,017$ ) e cicatrização mais precoce ( $p<0,001$ ). No grupo LC, predominou: lesões ulceradas ( $p=0,002$ ); amastigotas no exame histopatológico ( $p=0,005$ ); e positividade na cultura ( $p=0,001$ ). Observou-se a maior positividade nos exames parasitológicos no grupo LC. Em 58,8% dos pacientes deste grupo houve positividade em três ou mais testes, enquanto que no grupo LRE todos os casos foram positivos em apenas um destes, principalmente na PCR ( $p=0,030$ ). No estudo *in situ* o grupo LC apresentou maior percentual de linfócitos CD22, macrófagos, células NK, marcadores inflamatórios relacionados à ativação/proliferação celular e citocinas de regulação. Já os pacientes LRE tiveram maior percentual de linfócitos CD8, CD62E e de IFN- $\gamma$ , bem como presença de *neutrophil extracellular traps* (NETs). Esses resultados indicam uma menor carga parasitária no grupo LRE, evidenciada pela dificuldade de confirmação diagnóstica por exames parasitológicos. O processo inflamatório foi mais exacerbado nos pacientes LC. O equilíbrio entre produção de citocinas de regulação, baixa carga parasitária, ativação macrofágica eficiente e ativação endotelial poderia contribuir para a resolução espontânea precoce. Nossos resultados sugerem uma menor carga parasitária nos casos LRE, evidenciada pela dificuldade de confirmação diagnóstica por exames parasitológicos, o que poderia facilitar o controle da infecção. A literatura aponta a ausência/deficiência de tratamento específico como fator predisponente para o desenvolvimento de recidivas cutâneas e/ou metástases na LTA. No entanto, devido à potencial toxicidade dos fármacos indicados para seu tratamento, é possível discutir a validade de se instituir terapia medicamentosa na LTA com evolução para a cura espontânea precoce. O grupo LRE aqui estudado foi acompanhado por até 5 anos após a cura clínica, e em nenhum dos casos houve evidência de recrudescimento da infecção, sugerindo, portanto, que não se justifica instituir tratamento para estes pacientes. Entretanto, acompanhamento clínico e otorrinolaringológico periódico é aconselhável para detectar uma possível recorrência.

**Palavras-chave:** 1. Leishmaniose cutânea. 2. Cicatrização. 3. Imunologia. 4. Remissão espontânea.



Ribeiro, C. de O. **Comparative study of patients with cutaneous leishmaniasis with early spontaneous resolution to those who required specific treatment in Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz.** Rio de Janeiro, 2015. 115 p. Master [Thesis in Clinical Research in Infectious Diseases] – National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas.

## ABSTRACT

Early spontaneous resolution of lesions in American tegumentary leishmaniasis (ATL) is still poorly understood and may be related to the species of *Leishmania* and to the immune mediated response of the host. The objective of this study was to compare clinical and laboratory data as well as *in situ* immune response profile in patients requiring specific treatment (CL) with those individuals who developed spontaneous resolution without treatment (SRL). The SRL group comprised 13 (2.9%) cases, and the CL group, 432 patients. Clinical and laboratory data by the time of the diagnostic investigation were compared. Subsequently, 12 SRL patients presenting histological cryopreserved fragments were matched (according to sex, age and location of the lesion) with 24 CL patients, in order to perform immunohistochemistry study. SRL group had a higher percentage of: single lesion ( $p = 0.027$ ); scarring on initial examination ( $p = 0.001$ ); lesion located in the posterior trunk ( $p = 0.017$ ) and earlier healing ( $p < 0.001$ ). In the CL group predominated: ulcerated lesions ( $p = 0.002$ ); amastigotes in the histopathological examination ( $p = 0.005$ ); and positive culture ( $p = 0.001$ ). Higher positivity in parasitological tests in the CL group was observed. 58.8% of these patients was positive in three or more tests, whereas all cases of SRL group were positive in only one of these, mainly in PCR ( $p = 0.030$ ). In the *in situ* study the CL group had a higher percentage of CD22 lymphocytes, macrophages, NK cells, inflammatory markers related to activation / cell proliferation and cytokine regulation. SRL patients presented a higher percentage of CD8 lymphocytes, CD62E and IFN- $\gamma$ , as well as the presence of *neutrophil extracellular traps* (NETs). These results suggest a lower parasite load in the SRL group, evidenced by the difficulty of diagnostic confirmation through parasitological tests. The inflammatory process was more exacerbated in CL patients. The balance among production of regulatory cytokines, low parasite load, efficient macrophage activation, and endothelial activation could contribute to early spontaneous resolution. Our results suggest a lower parasite load in cases of SRL, evidenced by the difficulty of diagnostic confirmation through parasitological tests, which could facilitate infection control. The literature points to the absence /deficiency of specific treatment as a predisposing factor for the development of cutaneous recurrence and / or metastasis in ATL. However, the validity of the pharmacological therapy in ATL cases progressing to early spontaneous healing can be discussed, because of the potential toxicity of the drugs indicated for its treatment. The SRL group here studied was followed up throughout 5 years after clinical cure and in neither case there was any evidence of resurgence of the infection, therefore suggesting that it is justifiable not to treat these patients. However, periodic clinical and otorhinolaryngological exams are advisable to detect a possible recurrence.

**Keywords:** 1. Cutaneous leishmaniasis. 2. Wound healing. 3. Immunology. 4. Spontaneous remission.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- LTA-forma cutânea típica: (1A) Pré-tratamento. (1B) Epitelização. (1C) Cicatrização. LTA com resolução espontânea: (1D) Antes da investigação diagnóstica. (1E) Epitelização. (1F) Cicatrização-----13
- Figura 2- Organograma 1. Características da seleção de casos avaliados no presente estudo. TCLE- termo de consentimento livre e esclarecido; LTA- leishmaniose tegumentar americana; HIV – vírus da imunodeficiência adquirida; LC- leishmaniose cutânea curada após tratamento; LRE- leishmaniose cutânea com resolução espontânea precoce; INI-Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas-----25
- Figura 3- Organograma 2. Seleção dos grupos de estudo das etapas 1 (estudo clínico laboratorial) e 2 (resposta imune *in situ* por imunohistoquímica). LC- leishmaniose cutânea curada após tratamento; LRE- leishmaniose cutânea com resolução espontânea precoce; IDRM- intradermorreação de Montenegro; RIFI- reação de imunofluorescência indireta; ELISA- ensaio imunoenzimático; PCR- reação em cadeia pela polimerase---35
- Figura 4- Avaliação da resposta inflamatória *in situ* por imunohistoquímica no grupo LRE e grupo LC. Marcações positivas em castanho-enegrenado. (A) e (B) células T CD4. (C) e (D) células T CD8. (E) e (F) células T CD22. Aumento 100X na fotos A e B, e 400X nas demais. Setas indicam áreas de positividade-----58
- Figura 5- Contagem percentual dos marcadores estudados nas lesões cutâneas dos pacientes de resolução espontânea precoce (LRE) e de pacientes com leishmaniose cutânea curada após tratamento específico (LC). (A) CD8, (B) CD22, (C) CD56 e (D) Granzima B. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo-----59
- Figura 6- Avaliação da resposta inflamatória *in situ* por imunohistoquímica no grupo de leishmaniose de resolução espontânea precoce: Neutrófilos e formação de NETs. (a) Aumento 100X. (b) Aumento 200X. Aumento 1000X nas demais. Setas indicam exemplos de formação das NETs-----60
- Figura 7- Contagem percentual dos marcadores estudados nas lesões cutâneas dos pacientes de resolução espontânea precoce (LRE) e de pacientes com leishmaniose cutânea curada após tratamento específico (LC). (A) Macrófagos e (B) Arginase. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo-----61
- Figura 8- Contagem percentual dos marcadores estudados nas lesões cutâneas dos pacientes de resolução espontânea (LRE) e de pacientes que necessitaram de tratamento

(LC). (A) IL-17, (B) Interferon-gama, (C)IL-33 e (D) FoxP3. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo-----62

Figura 9- Matriz de dispersão dos níveis de macrófagos (MØ, ST2L e IL-33 entre os grupos de resolução espontânea (LRE) e de pacientes que necessitaram de tratamento (LC)-----63

## ARTIGO

Figure 1- American cutaneous leishmaniasis (ACL), typical skin lesion: (a) Pretreatment. (b) Epithelialization. (c) Wound healing. ACL, early spontaneous healing (d) Before diagnosis. (e) Epithelialization. (f) Healing -----50

Figure 2- Kaplan-Meier curve; 435 patients with American cutaneous leishmaniasis according to treatment (CL) / no treatment (ESH) groups and healing time. Continuous line - CL Group: patients with cutaneous leishmaniasis who undergone specific treatment. Dashed line - ESH group: patients with early spontaneous healing.  $p$ -value  $<0,001$ - INI / Fiocruz, 2002-2013-----51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Marcadores celulares e funcionais usados no estudo <i>in situ</i> por imunohistoquímica-----	33
Tabela 2- Achados no exame anatomopatológico de 36 pacientes com LTA apresentando cura espontânea precoce ou após tratamento-----	55
Tabela 3- Contagem percentual e por mm <sup>2</sup> dos marcadores estudados nos sítios de lesões cutâneas do grupo de resolução espontânea (LRE) em comparação ao grupo de leishmaniose cutânea curada após tratamento específico (LC)-----	57
Tabela 4- Comparação de intensidade da expressão das enzimas óxido nítrico sintase, E-selectina e fator de crescimento tumoral beta entre os grupos analisados-----	61

## ARTIGO

Table 1- Distribution of the characteristics of 445 patients with cutaneous leishmaniasis according to the need for treatment (CL) or no treatment (ESH), INI / Fiocruz, Brazil (2002-2013)-----	52
Table 2- Positivity in confirmatory exams* of 445 patients with localized cutaneous leishmaniasis. INI / Fiocruz (2002-2013)-----	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AEC- *3-amino-9-ethylcarbazole* (3-amino-9-etilcarbazol)
- Ag- Antígeno(s)
- CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CD– *cluster of differentiation* (grupo de diferenciação)
- CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
- DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio por imunoabsorção por ligação enzimática)
- EUA – Estados Unidos da América
- FIOCRUZ-Fundação Instituto Oswaldo Cruz
- Foxp3- *Forkhead Box P3*
- HIV- *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)
- IDRM- Intradermorreação de Montenegro
- IFN- $\gamma$  - *interferon gamma* (Interferon-gama)
- Ig-Imunoglobulina
- IL – Interleucina
- INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
- iNOS- *inducible nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintase induzida)
- LAPCLIN VIGILEISH-Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses
- LC- Leishmaniose cutânea
- LCL- Leishmaniose cutânea localizada
- LM- Leishmaniose mucosa
- LRE- Leishmaniose de resolução espontânea
- LTA – Leishmaniose tegumentar americana
- MHC- *Major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)
- MØ- Macrófago
- NEU – Neutrófilo

NET- *neutrophil extracellular traps* (redes neutrofílicas extracelulares)

NNN - *McNeal, Novy & Nicole*

NK- *natural killers* (células exterminadoras naturais)

NO- *nitric oxide* (óxido nítrico)

NOS- *nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintase)

OCT- *optimum cutting temperature* (temperatura de corte ótima)

PBS – *phosphate Buffer saline* (tampão salina fosfato)

PCR – *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

RIFI- *indirect immunofluorescence reaction* (reação de imunofluorescência indireta)

Sb<sup>5+</sup>- antimônio pentavalente

SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

S(t) – *survival function* (probabilidade de sobrevivência)

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCR- *T cell receptor* (receptor de célula T)

TGF-β- *transforming growth factor beta* (fator de transformação de crescimento beta)

Th1- *T helper 1* (linfócitos T auxiliares 1)

Th2- *T helper 2* (linfócitos T auxiliares 2)

TNF-α- *tumoral necrosis factor alfa* (fator de necrose tumoral alfa)

TNF-β- *tumoral necrosis factor beta* (fator de necrose tumoral beta)

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	1
1.2 O DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DA LTA .....	5
1.3 O TRATAMENTO DA LTA .....	10
1.4 A RESOLUÇÃO ESPONTÂNEA DE LESÕES NA LCL.....	11
1.5 MARCADORES DE PERFIL CELULAR E INFLAMAÇÃO TECIDUAL .....	14
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	22
3.1 OBJETIVO GERAL .....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
4.1 SELEÇÃO DE PACIENTES.....	24
4.2 ETAPA 1: ANÁLISE CLÍNICA. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EM PACIENTES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA APRESENTANDO A FORMA CUTÂNEA LOCALIZADA, SUBMETIDOS À TERAPÊUTICA ESPECÍFICA E NAQUELES COM RESOLUÇÃO ESPONTÂNEA PRECOCE.....	26
<b>4.2.1 Análise estatística descritiva</b> .....	28
<b>4.2.2 Análise de sobrevivência</b> .....	29
4.3 ETAPA 2: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA. ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE <i>IN SITU</i> . AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE PARÂMETROS DE RESPOSTA IMUNE <i>IN SITU</i> EM PACIENTES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA APRESENTANDO A FORMA CUTÂNEA LOCALIZADA SUBMETIDOS À TERAPÊUTICA ESPECÍFICA, E NAQUELES COM RESOLUÇÃO ESPONTÂNEA PRECOCE.....	30
<b>4.3.1 Coleta de material biológico</b> .....	31
<b>4.3.2 Preparação dos fragmentos teciduais</b> .....	31
<b>4.3.3 Imunohistoquímica</b> .....	32
<b>4.3.4 Análise estatística da etapa 2</b> .....	34
<b>5 RESULTADOS</b> .....	35
5.1 ETAPA 1. AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	36
<b>5.1.2 Artigo científico</b> .....	37
5.2 ETAPA 2. ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE <i>in situ</i> NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	54
<b>5.2.1 Resultados</b> .....	54
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	64

<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	76
<b>8 DESDOBRAMENTOS</b> .....	79
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	80
<b>APÊNDICE</b> .....	89
<b>ANEXOS</b> .....	90
<b>Anexo I</b> .....	90
<b>Anexo II</b> .....	96



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, transmitidos por algumas espécies de insetos flebotomíneos (Mattos, 1993; Guerra et al, 2003; Silveira, Lainson & Corbett, 2004). Representa um problema de saúde pública, sendo que em 2013 foram notificados 1,5 milhão de casos novos. Destes, aproximadamente 18.266 no Brasil. Neste mesmo ano, a taxa de detecção da doença em nosso país foi de 9,1 casos/ 100.000 habitantes (Ministério da Saúde, 2014).

Nas Américas, pelo menos 16 diferentes espécies de *Leishmania* foram identificadas como agentes causais de leishmaniose em ambos os subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Silveira, Lainson & Corbett, 2004). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2010), as espécies mais comuns são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Na Amazônia estão presentes as três espécies de *Leishmania*, cada qual com peculiaridades clínicas e epidemiológicas (Ministério da Saúde, 2010). A *Leishmania (Viannia) braziliensis* tem também ampla distribuição extramazônica, do sul do Pará ao Nordeste, atingindo também o centro sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental. É a mais frequente em todo o país, sendo responsável pela quase totalidade dos casos no Rio de Janeiro, onde apresenta padrão de transmissão intra e peri-domiciliar (Meneses et al,

2002; Souza et al, 2002).

Dependendo da espécie infectante e da resposta imune celular do hospedeiro podem-se desenvolver variadas formas clínicas da doença (Silveira, Lainson & Corbett, 2004). Fatores como quantidade de parasitos inoculados, local de inoculação, presença de comorbidades e o estado nutricional do hospedeiro podem influenciar a apresentação clínica (Farah Klaus & Frankenburg, 1993). Assim, a LTA pode cursar com comprometimento cutâneo, mucoso e linfonodal, apresentando grande diversidade de manifestações.

Marzochi & Marzochi propuseram uma classificação da doença baseada em aspectos clínicos e evolutivos. Desta forma, a LTA foi dividida em grupos. Com base nestes autores, haveria o grupo subclínico (leishmaniose cutânea inaparente ou subclínica); o grupo cutâneo (leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea disseminada, leishmaniose cutânea difusa); o grupo mucoso ou leishmaniose mucosa (leishmaniose mucosa tardia, leishmaniose mucosa indeterminada, leishmaniose mucosa primária); o grupo misto ou leishmaniose mucocutânea (forma mucocutânea concomitante, forma mucocutânea contígua); e, finalmente o grupo linfático ou leishmaniose linfática (Marzochi & Marzochi, 1994).

De forma geral, a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* manifesta-se como leishmaniose cutânea e mucocutânea. A infecção produzida por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* produz lesões cutâneas, tanto formas típicas (leishmaniose cutânea) quanto a forma cutânea difusa anérgica (Silveira, Lainson & Corbett, 2004; Ministério da Saúde, 2010; Azeredo-Coutinho et al, 2007). A *Leishmania (Viannia) guyanensis* provoca quadros cutâneos típicos e raramente formas mucosas, por contiguidade ou inoculação direta (Ministério da Saúde, 2010).

A leishmaniose cutânea (LC), forma clínica predominante da LTA, é definida

pela presença de lesões exclusivamente cutâneas, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes através da picada do vetor, em áreas descobertas do tegumento, para qualquer das espécies de *Leishmania* causadoras da doença. Em um número considerável de casos, a infecção progride e, após um período de latência clínica variável (de semanas a meses), surgem as úlceras cutâneas (Furtado, 1994).

A LC apresenta-se sob as formas clínicas: localizada, disseminada, recidiva cútis, difusa e lesões atípicas (Ministério da Saúde, 2010). Independentemente das espécies de *Leishmania* identificadas, o aspecto clínico mais característico das lesões cutâneas da LC é semelhante e denominado leishmaniose cutânea localizada (LCL) (Mattos, 1993; Guerra et al, 2003; Silveira, Lainson & Corbett, 2004; Ministério da Saúde, 2010). A forma cutânea localizada (LCL) representa o acometimento primário da pele, com grande relevância clínica em áreas endêmicas, ou onde a infecção ocorre esporadicamente. Caracteristicamente há uma ou poucas úlceras indolores com bordas elevadas, infiltradas, eritematovioláceas (“bordas em moldura”) e fundo granuloso com pouca secreção. Linfangite e adenite regional podem preceder ou acompanhar as lesões de pele (Ministério da Saúde, 2010). Costuma ter boa resposta ao tratamento (Ministério da Saúde, 2010). Habitualmente, se não diagnosticada e tratada, a úlcera da leishmaniose cutânea evolui para cura espontânea em alguns meses. A LC pode cursar com manifestações dermatológicas atípicas apresentando-se com lesões verrucosas, acneiformes, vegetantes, esporotricóides, dentre outras (Bari & Raham, 2008; Ministério da Saúde, 2010).

A forma cutânea disseminada é rara, caracterizando-se pelo surgimento de múltiplas lesões ulceradas (em número igual ou superior a 10), pápulas e/ou lesões com aspecto acneiforme, com envolvimento de áreas não contíguas do tegumento. O número de lesões difere bastante, com tendência à disseminação e acometimento de face e

tronco. O acometimento de mucosas ocorre em proporção variável destes casos (Turetz et al, 2002; Machado et al, 2011). A adenomegalia satélite é rara e, quando detectada, tem aparência discreta (Ministério da Saúde, 2010).

Na forma recidiva cútis há reaparecimento de lesão após período variável, posteriormente à sua involução pós-terapêutica ou como curso natural da infecção. Nota-se aspecto papuloso, com reativação localizada na borda da lesão. A resposta terapêutica é pobre ou ausente e a intradermorreação de Montenegro (IDRM) cursa com positividade (Ministério da Saúde, 2010).

A forma cutânea difusa representa um estado de anergia imunológica específica a antígenos da *Leishmania* com infiltração de áreas do tegumento. Como consequência à deficiência imune celular, há negatividade na IDRM e resposta terapêutica insuficiente (Ministério da Saúde, 2010). A infiltração cutânea pode ser extensa simulando quadros de hanseníase virchowiana ou mesmo linfomas cutâneos (Pearson & Sousa, 1996; Grevelink & Lerner, 1996).

Formas cutâneas da doença devem ser diferenciadas prioritariamente das úlceras traumáticas, úlceras de estase, úlcera tropical, úlceras de membros inferiores por anemia falciforme, piodermites, micoses subcutâneas e sistêmicas, neoplasias cutâneas, sífilis e tuberculose cutânea (Gontijo, 2003).

As lesões cutâneas ulceradas, ao evoluírem para a cura, deixam cicatrizes atróficas, deprimidas, com superfície lisa, áreas de hipo ou de hiperpigmentação e ocasionalmente traves fibrosas (Ministério da Saúde, 2010).

A principal complicação na LTA provocada por *L. (V.) braziliensis* é a metástase para as mucosas das vias aerodigestivas superiores (principalmente nas mucosas do nariz, boca, faringe e laringe), com destruição desses tecidos (Ministério da Saúde, 2010; Moreira, 1994). A leishmaniose mucosa (LM) ocorre após meses ou anos do

aparecimento da lesão inicial, sugerindo uma possível disseminação dos parasitos por via hemática. Todavia, há casos em que a LM surge de forma isolada ou concomitante a lesões cutâneas (Silveira et al., 2004). As formas mucosas, apesar de cursarem com baixa mortalidade (aproximadamente 5%) são de difícil tratamento e não cicatrizam sem instituição de terapêutica específica (Marsden, 1986). Os fatores que contribuem para progressão para forma mucosa não são totalmente elucidados, todavia a demora na cicatrização da lesão inicial e tratamento inicial inadequado podem estar associados com surgimento de LM (Marsden, 1986).

As formas mucosas da LTA devem ser diferenciadas de paracoccidioidomicose, hanseníase virchowiana, rinoscleroma, boubá, sífilis terciária, granuloma facial da linha média e neoplasias (Gontijo, 2003).

No cotidiano do Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LAPCLIN VIGILEISH) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), as formas de LCL que cursam com resolução espontânea precoce representam um desafio à prática clínica diária. Ainda na fase de investigação diagnóstica, alguns pacientes apresentam lesões que evoluem com sinais de epitelização e/ou cicatrização, a ponto de não necessitarem de tratamento específico, apesar da confirmação parasitológica do caso.

## 1.2 O DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DA LTA

A história epidemiológica e a avaliação clínica podem ser insuficientes para a confirmação diagnóstica de LTA, sendo muitas vezes necessária a realização de exames para a visualização do parasito. Os métodos parasitológicos são considerados de certeza, por basearem-se na evidenciação do parasito de forma direta ou indireta. São eles:

exame direto (material coletado por escarificação de lesão cutânea ou *imprint* de fragmento de lesão obtido através de biópsia), exame histopatológico, imunohistoquímico e isolamento do parasito em cultura do fragmento da lesão (a partir de amostras obtidas por procedimento de escarificação ou biópsia) (Ministério da Saúde, 2010). As técnicas de exame direto, por escarificação ou *imprint*, permitem confirmação diagnóstica com elevada sensibilidade (Mello et al, 2011). O encontro do parasito nos exames parasitológicos diretos realizados em escarificação de lesão é o padrão ouro para o diagnóstico segundo o Ministério da Saúde, com sensibilidade que varia de acordo com a literatura de 32,7% a 90,4% (Mello et al, 2011). Todavia, na experiência do LAPCLIN VIGILEISH, a cultura é considerada o padrão ouro no diagnóstico da LTA. Por ser uma técnica parasitológica por definição, possui 100% de especificidade e apresenta valores de sensibilidade que variam de 47,1% (Romero et al, 1999) a 86,2% (Mello et al, 2011).

Os índices de sensibilidade do exame histopatológico na literatura apresentam ampla variação (Furtado, 1980; Amato, Andrade & Duarte, 2003). Este exame é útil para descartar outras doenças granulomatosas, infecções fúngicas ou outros diagnósticos. Há descrições, no entanto, que ressaltam que tanto esfregaços corados pelo Giemsa quanto a cultura são considerados mais sensíveis do que a histopatologia no diagnóstico de LTA (Convit et al, 1993). A técnica de imunohistoquímica demonstra maior sensibilidade que a coloração por hematoxilina-eosina para a detecção do parasito (Quintella et al, 2009). O isolamento do parasito em fragmento de lesão semeado em meios de cultura apropriados permite a visualização de formas promastigotas com maiores valores de sensibilidade (Furtado, 1980; Romero et al, 2001).

As alterações histopatológicas são pleomórficas e podem variar de acordo com a espécie infectante e o *status* imunológico do hospedeiro. A epiderme pode apresentar

hiperplasia pseudoepiteliomatosa, além de hiperkeratose, parakeratose, degeneração de células basais, atrofia ou acantose e abscessos intraepidérmicos (Grevelink et al., 1996). Na derme observa-se, nas lesões iniciais, infiltrado composto por macrófagos parasitados, frequentemente com esboço ou formação de granulomas, histiócitos, linfócitos, células gigantes e plasmócitos (De Magalhães et al., 1982; De Magalhães et al., 1986).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta útil para confirmação diagnóstica, com elevada sensibilidade, além de permitir a diferenciação entre espécies infectantes (Rodrigues et al, 1994; Fagundes et al, 2007). A partir da utilização de PCR, tornou-se possível a avaliação da expressão de citocinas *in situ* em lesões produzidas por *L. (V.) braziliensis* ampliando o uso desta técnica para diagnóstico e prognóstico da evolução das lesões. O conhecimento genético gerado pela PCR, tanto das características do ser humano quanto do agente causal, permitiu melhor compreensão da interação entre os fatores de virulência do parasito e características do hospedeiro, abrindo campo para elaboração de novos métodos terapêuticos (Mitropoulos et al, 2010).

Além da visualização direta do parasito, outros exames indiretos, como a intradermoreação de Montenegro (IDRM) e as provas sorológicas, podem ser usados como coadjuvantes no diagnóstico de LTA.

A IDRM constitui-se num marcador para avaliação da resposta celular de hipersensibilidade retardada a antígeno de *Leishmania* inoculado por via intradérmica, sendo amplamente utilizada para diagnóstico presuntivo e em inquéritos epidemiológicos (Marzochi, 1980; Cuba-Cuba et al, 1985; José et al, 2001; Manzur & Bari, 2006; Sadeghian et al, 2006). É geralmente o único exame complementar disponível para o diagnóstico de LTA em muitas unidades de saúde. Pode ser negativa

nas primeiras quatro a seis semanas a partir do início da lesão cutânea (Ministério da Saúde, 2010) e pode se apresentar positiva em 20-30% dos indivíduos residentes em áreas endêmicas que não apresentam lesão ativa ou cicatriz sugestiva de leishmaniose (Ministério da Saúde, 2010; Fagundes et al, 2007a/b). Sua positividade independe da duração das lesões, do gênero ou da idade dos pacientes (Manzur & Bari, 2006), sendo de alta sensibilidade com positividade próxima a 100% em pacientes com LTA (Furtado, 1980; Mendonça et al, 1986). A positividade da IDRM em casos de esporotricose confirmada já foi alvo de investigação no Rio de Janeiro (De-Lima-Barros et al, 2005), tendo sido aventadas três possibilidades para explicar este fato: co-infecção, reação cruzada entre estas duas condições, e alergia ao diluente (uso de timerosal ou formol nas preparações do reagente, podendo induzir uma reação de hipersensibilidade cutânea, causando resultados falso-positivos) (Pineda et al, 2001; De-Lima-Barros et al, 2005; Fagundes et al, 2007).

Nos pacientes com LC, constatam-se níveis geralmente baixos ou moderados de anticorpos específicos detectados por reação de imunofluorescência indireta para antígenos de *Leishmania* (RIFI) ou ensaio imunoenzimático (ELISA), em comparação com os níveis encontrados nos pacientes com formas mucosas da enfermidade; entretanto, existem variações individuais (Anthony, Christensen & Johnson, 1980; Guimarães et al, 1983).

Os casos de LM caracterizam-se por apresentar IDRM fortemente positiva, e difícil confirmação parasitológica devido à escassez parasitária. As lesões mucosas apresentam testes sorológicos (RIFI e/ou ELISA) com títulos mais elevados e persistentes que as formas cutâneas (Ministério da Saúde, 2010).

No prognóstico da LTA, a resposta imune tem sido apontada como determinante para a evolução das lesões para cura ou para seu agravamento. Neste contexto, os



linfócitos T auxiliares 1 e 2 (Th1 e Th2) assumem importante papel no combate à infecção pela *Leishmania spp.* O equilíbrio entre resposta imunológica do tipo Th1 e Th2 é fator determinante na forma clínica, bem como na progressão da doença. Estudos demonstram que nas lesões cutâneas há predomínio de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), enquanto que na LM há um padrão heterogêneo de citocinas produzidas por linfócitos T auxiliares 1 e 2 (Th1 e Th2), com nítido predomínio de interleucina 4 (IL-4) (Pirmez et al., 1993). Desta forma, o predomínio de um padrão de resposta Th1 equilibrada na LC levaria ao controle de carga parasitária com resolução da lesão cutânea. Já na LM, o aumento exagerado da resposta tipo Th1, associada à resposta tipo Th2, com consequente presença de IL-4, resultaria em cronicidade e maior resistência às terapias (Pirmez et al, 1993). Tanto o IFN- $\gamma$  quanto o fator de necrose tumoral  $\alpha$  e  $\beta$  (TNF-  $\alpha$ , TNF- $\beta$ , respectivamente) do perfil de resposta Th1 estão envolvidos na resistência à infecção e eliminação parasitária, enquanto que citocinas do perfil Th2, como a IL-4 e a interleucina 10 (IL-10) são relacionada à susceptibilidade à infecção (Souza et al, 2013). As lesões cutâneas iniciais causadas pela infecção com a *L. (V.) braziliensis* têm níveis mais elevados de fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ). Sugere-se que o TGF- $\beta$  seja produzido por macrófagos recentemente infectados e está diretamente relacionado com o estabelecimento da infecção nos estágios iniciais da doença. (Barral-Neto, 1995). Recentemente, estudos demonstraram que a interleucina 17 (IL-17) está envolvida na cronicidade de lesões (Bacellar et al, 2009). Ademais, a interleucina 22 (IL-22) está envolvida na imunidade do epitélio e da superfície das mucosas (Korn et al,2009).

O mecanismo pelo qual ocorre o controle da infecção ainda é desconhecido, apesar do reconhecimento importante do papel desempenhado pelas citocinas. Observou-se maior expressão de IFN- $\gamma$ , interleucina 10 (IL-10) e TGF- $\beta$  em lesões de pacientes que evoluíram com pior resposta ao tratamento (Marreti-Mitra et al., 2010).

### 1.3 O TRATAMENTO DA LTA

Os medicamentos recomendados para o tratamento de LTA cutânea têm elevada toxicidade sistêmica (Antezana et al. 1992; Brummitt et al. 1996; Halim et al. 1993; McBride et al. 1995; Rozenfeld & Pepe 1992/93; Saenz et al. 1991; Veiga et al. 1983), ocasionalmente levando a fatalidades (Lima et al, 2007). Os antimoniais pentavalentes constituem as drogas de primeira linha para o tratamento das leishmanioses (Goodwin 1995, Herwaldt 1992) com sensibilidades variadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Azeredo-Coutinho et al, 2007).

Diferentes regimes terapêuticos têm sido sugeridos com algumas diferenças primordiais: uso de antimoniato de meglumina ou de estibogliconato de sódio, via de administração, administração contínua ou intermitente da droga, dose diária, duração do tratamento, critérios utilizados para interromper ou para prolongar o tratamento e as espécies e cepas de *Leishmania* envolvidas (Berman, 1982).

O Ministério da Saúde recomenda o tratamento da LTA com antimoniato de meglumina na dose de 10 a 20 mg de antimônio pentavalente ( $Sb^{5+}$ )/quilograma de peso / dia durante 20 dias (Ministério da Saúde, 2010). Os pacientes com LM devem utilizar 20mg  $Sb^{5+}$ /kg/dia durante 30 dias. Em ambos os casos, deve-se respeitar o limite máximo de 3 ampolas diárias. Se não houver cicatrização completa após 12 semanas do término do tratamento, o esquema terapêutico deverá ser repetido durante 30 dias apenas por uma vez. Em caso de não resposta, deve-se utilizar uma das drogas de segunda escolha como a anfotericina B ou a pentamidina (Ministério da Saúde 2010).

No LAPCLIN VIGILEISH, os pacientes com LC são tratados rotineiramente com antimoniato de meglumina 5 mg  $Sb^{5+}$ /kg/dia por 30 dias (Oliveira-Neto, 1997). Mesmo que não ocorra epitelização das lesões ao final do esquema terapêutico, o

mesmo é interrompido com reavaliação periódica do paciente até a epitelização das lesões ulceradas (cura imediata). Nos meses seguintes à epitelização, observa-se o sucessivo desaparecimento das crostas, da descamação, da infiltração e posteriormente, do eritema, com o desenvolvimento de cicatriz (cura tardia).

Outras drogas como a anfotericina B e a pentamidina são consideradas de segunda escolha, e devem ser indicadas em casos de resistência ou contra-indicação aos antimoniais. No entanto, apresentam toxicidade e eficácia semelhantes.

#### 1.4 A RESOLUÇÃO ESPONTÂNEA DE LESÕES NA LCL

Alguns indivíduos evoluem com cura precoce da lesão cutânea de LCL, muitas vezes sem procurar atendimento médico. Outros permanecem meses com a lesão em atividade e o processo de cicatrização mostra-se lento. Tal fenômeno pode ser explicado pelo estabelecimento precoce ou tardio de uma resposta imune específica eficiente na eliminação do parasito. O processo de cura das lesões de LCL é hoje objeto de estudo de vários grupos de pesquisa (Ministério da Saúde, 2010).

A partir da observação do fenômeno de resolução espontânea de lesões cutâneas, ainda durante o processo de investigação, a ponto de não necessitarem de tratamento específico, algumas hipóteses podem ser cogitadas. Para esclarecer esta questão pode-se inferir que a resposta imune do hospedeiro pode ter influência. Outra possibilidade seria a presença de características genéticas do parasito. No entanto, casos de cura espontânea têm sido descritos em praticamente todas as áreas endêmicas, independente da predominância da espécie envolvida.

No estado do Rio Janeiro, como o parasito tem se mostrado bastante homogêneo

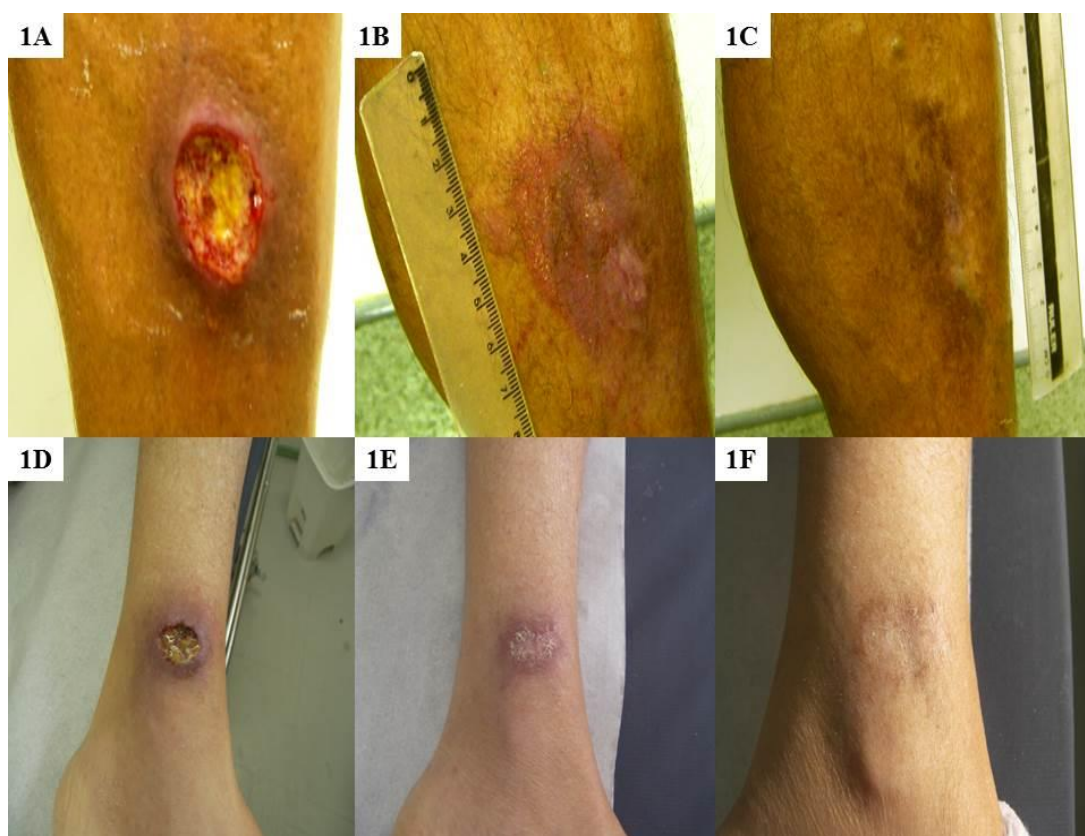
em termos de espécie e variabilidade genética (Azeredo-Coutinho et al, 2007; Baptista et al, 2009), tem-se a oportunidade de melhor avaliar a influência do hospedeiro.

As lesões de LTA são caracterizadas pela reação inflamatória do tipo crônico granulomatoso, com intensa infiltração linfoplasmocitária (Quintella et al, 2009). Nas lesões típicas, ou seja, naquelas com presença de úlceras com bordas infiltradas e fundo granuloso, já foi descrita a predominância de linfócitos T, macrófagos e neutrófilos (Morgado et al, 2008). A formação da úlcera tem sido sugerida no modelo murino de estudo como sendo decorrente do processo inflamatório, e não necessariamente pela presença do parasito (Belkaid et al, 2002). Desta forma, a lesão surge no momento em que o processo inflamatório começa a se instalar e neste mesmo ponto a carga parasitária diminui (Belkaid et al, 2002). Com base nestes dados duas hipóteses surgem para a compreensão da ocorrência de resolução espontânea na LTA: 1 – A carga parasitária é menor nestes casos levando ao menor estímulo da resposta imune específica, o que torna mais fácil a regulação e controle; 2 – A resposta imune local no paciente apresentando resolução espontânea da enfermidade tende ao equilíbrio, com diminuição dos fenômenos de toxicidade celular e conseqüente destruição tecidual, independente da carga parasitária.

O critério de cura da LTA é essencialmente clínico, sendo indicado o acompanhamento regular por 12 meses. Entretanto, para fins de encerramento do caso no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), não é necessário aguardar o término do acompanhamento. Nas formas cutâneas, a cura é definida pelo Ministério da Saúde como a epitelização das lesões ulceradas, regressão total da infiltração e eritema, até três meses após a conclusão do esquema terapêutico. Entretanto, nos casos com evidência de cicatrização progressiva das lesões sem cumprir completamente com os critérios acima, sugere-se o prolongamento da observação até

completar seis meses. O paciente deve retornar mensalmente à consulta durante três meses consecutivos após o término do esquema terapêutico para ser avaliada a cura clínica. Uma vez curado, o mesmo deverá ser acompanhado de dois em dois meses até completar 12 meses após o tratamento (Ministério de Saúde, 2010).

A Figura 1 demonstra as evoluções esperadas da forma típica sob tratamento ou com resolução espontânea precoce. Observa-se a semelhança morfológica das lesões cutâneas ao longo do tempo, diferindo no tempo de evolução para epitelização e cicatrização, mais curto nos casos de resolução espontânea precoce.



**Figura 1.** LTA-forma cutânea típica: (1A) Pré-tratamento. (1B) Epitelização. (1C) Cicatrização. LTA com resolução espontânea precoce: (1D) Antes da investigação diagnóstica. (1E) Epitelização. (1F) Cicatrização.

## 1.5 MARCADORES DE PERFIL CELULAR E INFLAMAÇÃO TECIDUAL

A evolução favorável ou progressiva da enfermidade, bem como um espectro variável de formas clínicas, podem se desenvolver na dependência da espécie de *Leishmania* e/ou de características da resposta imune do hospedeiro. É bem estabelecido que o desequilíbrio nesta resposta, para mais ou para menos, produz lesões mais graves, respectivamente, lesões mucosas e a forma cutânea difusa (Ministério da Saúde, 2010).

Neste contexto, torna-se importante a caracterização imunofenotípica do infiltrado inflamatório, através de estudos *in situ*. Pelo conhecimento da composição e arquitetura dos infiltrados, a complexidade da resposta contra o agente pôde ser mais bem entendida. Assim, caracterizar a resposta inflamatória local, o tipo e a função das células envolvidas têm-se mostrado importante na compreensão das diferentes apresentações clínicas de LTA. Isto se torna mais evidente nos casos de resolução espontânea, onde seria possível verificar fatores ligados ao controle da reação inflamatória e, conseqüentemente à contenção da infecção.

A resposta imune adaptativa é centrada nos linfócitos, divididos em linfócitos B e T, os últimos com fenótipo auxiliares ou *helper*, citotóxicos e reguladores. Os linfócitos B apresentam a molécula CD22 como marcador de superfície, via sinalização transmembrana. É a principal célula efetora da imunidade humoral que se caracteriza pela produção e liberação de anticorpos em resposta a antígenos (Ag) contra os quais foram gerados (Abbas & Lichtman, 2008). Já os linfócitos T apresentam em sua maioria o *T cell receptor* (TCR)  $\alpha\beta$  e as moléculas correceptoras, CD4 ou CD8, respectivamente. Os linfócitos T CD4 são responsáveis por orquestrar outras células da resposta imune na erradicação de patógenos, com importante função na ativação dos

linfócitos B, macrófagos (MØ), ou mesmo de linfócitos T CD8. Ambos os subtipos apresentam papel importante no controle de patógenos intracelulares (Parkin, 2001).

Os linfócitos T CD8 formam uma subpopulação com grande capacidade de produção de citocinas e, estão implicados em citotoxicidade celular direta. Outra célula com capacidade citotóxica são as células *natural killers* (NK), cujo principal marcador de superfície é o CD56. Células NK são definidas funcionalmente pela capacidade citotóxica espontânea "in vitro" contra células tumorais e infectadas (Abbas & Lichtman, 2008).

A principal via usada pelos linfócitos T citotóxicos e células NK, a fim de eliminar células patogênicas, é a exocitose de componentes granulares em direção às células-alvo, proporcionando sua destruição. Destacam-se a granzima B e a perforina que induzem a fragmentação do DNA de células-alvo, com posterior apoptose (Lord, 2003).

Na LTA típica, as lesões são caracterizadas pela intensa atividade de MØ ativados ao estágio parasiticida através da predominância da resposta imune celular Th1 (Morgado et al, 2008). A principal célula efetora da eliminação das amastigotas é o MØ o qual possui a glicoproteína transmembranar CD68 em seus lisossomos (Abbas & Lichtman, 2008). Na fisiopatogenia das leishmanioses, os MØs são ao mesmo tempo células hospedeiras, apresentadoras de antígeno e efetoras para a destruição do parasito, através da ação do óxido nítrico (NO) (Ministério da Saúde, 2010).

O NO é produzido a partir da L-arginina através da atuação de isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e atua nos mecanismos de citotoxicidade dos MØs contra microrganismos intracelulares. Três isoformas distintas de NOS foram identificadas, produtos de diferentes genes. Destaca-se a isoforma óxido nítrico sintase do tipo 2 (NOS2) ou óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que é expressa em uma

variada gama de doenças infecciosas e inflamatórias (Alderton, 2001). A L-arginina também pode ser metabolizada por outra enzima denominada arginase, levando a síntese de poliaminas e prolina. A arginase é expressa constitutivamente em granulócitos humanos, atuando como antagonista da iNOS. Desta forma, as citocinas de padrão Th1 induzem a produção de iNOS, e esta produção é contrabalanceada pelas citocinas Th2, que regulam a produção da arginase. Estudos demonstram que a arginase tem papel direto e indireto na indução da hiporresponsividade de linfócitos T e na progressão de variadas doenças infecciosas (Munder et al, 2005).

Os neutrófilos (NEU) são células polimorfonucleares efetoras do sistema imune inato, produzidas na medula óssea, que interagem com monócitos, células dendríticas, linfócitos T e linfócitos B, auxiliando a coordenação da resposta inflamatória. NEU são as primeiras células recrutadas para o local de inoculação da *Leishmania* e a sua participação no controle da carga parasitária tem sido demonstrada em modelos experimentais (Belkaid et al, 2000). A elastase neutrofílica é uma serina proteinase presente nos grânulos primários de leucócitos polimorfonucleares, os quais são liberados após sua ativação, sendo essencial para migração de neutrófilos através do tecido conectivo, fagocitose e defesa do hospedeiro contra microorganismos invasores (Abbas & Lichtman, 2008).

NETs (*neutrophil extracellular traps*) representam uma forma particular de morte descrita para os NEU, que ocorre com o lançamento de uma malha formada por cromatina associada com proteínas granulares e citoplasmáticas em um processo denominado NETosis. NETs são dotadas com propriedades para prender e matar microorganismos distintos tais como *Mycobacterium tuberculosis*, fungos, HIV-1, protozoários, bem como diferentes espécies de *Leishmania* (Brinkmann & Zychlinsky, 2007).



Outros marcadores também podem auxiliar na caracterização do tipo e/ou intensidade do processo inflamatório. Entre eles, destacam-se marcadores de ativação, proliferação celular, regulação e as citocinas. Alguns destes marcadores apontam para a exacerbação inflamatória da resposta imune enquanto que outros demonstram a presença de fatores ligados à regulação de tal resposta. Como exemplo, no primeiro grupo pode-se indicar as moléculas Ki67 e CD69, e entre os marcadores de regulação podemos citar o fator nuclear denominado *Forkhead Box P3* (FoxP3). Este binômio ativação/regulação sofre ainda influência de citocinas secretadas, e este conjunto define o tipo, a duração e a intensidade da resposta inflamatória.

A proteína Ki67 é uma das várias reguladores do ciclo celular. Ela reage com uma proteína não-histona nuclear, com expressão em todas as fases ativas do ciclo celular, com exceção da fase G0 (Gerdes et al, 1991). Desta forma, células em processo de proliferação celular expressam Ki67.

CD69 é um antígeno expresso na superfície de células T ativadas. Além disso, está constitutivamente expresso em timócitos imaturos, linfócitos B, células NK, monócitos, neutrófilos, dentre outros (Ziegler,1994).

A maior parte dos linfócitos T CD4 expressam constitutivamente a molécula CD25. Trata-se de um receptor de cadeia alfa da interleucina-2 (Sakaguchi et al,1995). No entanto, grande parte dos linfócitos T reguladores, além de CD25 também expressam FoxP3, que codifica um fator de transcrição fundamental no desenvolvimento e função destas células (Hori, 2003).

Além dos marcadores de atividade inflamatória e imunoregulação, as citocinas têm importante papel na determinação do tipo de intensidade da resposta imune e na manutenção/regulação do processo inflamatório. As citocinas podem ser didaticamente divididas em tipo 1, tipo 2 ou reguladoras, todavia, em muitos casos podem exercer

variadas funções, na dependência da quantidade e qualidade de outros produtos secretórios presentes no ambiente inflamatório.

O IFN- $\gamma$  é produzido pelos linfócitos T e por granulócitos, com importante atuação na resposta imune do tipo Th1. Nas células T CD4<sup>+</sup>, o principal estímulo para sua produção é a presença do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II associado a antígenos. De forma similar, as células T CD8<sup>+</sup> o produzem no contexto da ligação antígeno-MHC classe I. O IFN- $\gamma$  tem importante função na ativação de MØs, que constituem a principal linha de defesa contra patógenos intracelulares (Young, 1995).

Durante o processo inflamatório, a interleucina 17 (IL-17) está frequentemente presente em concentrações elevadas. Este mediador pode ser secretado por linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados, linfócitos T CD8<sup>+</sup>, e linfócitos T gama-delta, bem como várias células linfóides inatas, tais como as células NK. Atua regulando subpopulações de linfócitos T (Th17). Em humanos, a produção de IL-17 pelas células T CD8<sup>+</sup> e T gama delta é frequentemente acompanhada de secreção de IFN- $\gamma$  (Sabat et al, 2010).

A IL-33 é um membro da superfamília da interleucina 1 (IL-1) expressa principalmente pelas células do estroma, tais como as células epiteliais e endoteliais. Sua expressão é regulada positivamente após a estimulação pró-inflamatória. Ele medeia os seus efeitos biológicos através da interação com os receptores ST2 (IL-1RL1) e IL-1 do receptor de proteína acessório (IL-1RAcP), ambos os quais são amplamente expressos, particularmente em células imunes inatas e células Th2. A IL-33 induz fortemente a produção de citocinas Th2, a partir da ligação com estas células (Miller, 2011).

O TGF- $\beta$  age como molécula de sinalização e regula diversos processos celulares, incluindo a proliferação, diferenciação, plasticidade, migração e apoptose.

Sua produção alterada pode resultar em diversas formas de doenças inflamatórias ou infecciosas, bem como em processos cancerígenos e à fibrose tecidual (Huang, 2012).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória chave que atua como imunorregulador durante infecções contra vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos. Durante processos infecciosos, ela inibe a atividade das células Th1, das células NK e dos MØs. Variados tipos celulares (MØs, células dendríticas, linfócitos B, subclasses de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>) podem produzir IL-10, em diferentes tecidos ou durante as fases agudas ou crônicas da mesma infecção (Couper, 2008).

A IL-5 é produzida pela subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com perfil Th2, bem como por mastócitos ativados. Trata-se de uma citocina anti-inflamatória com função de estimular o crescimento, ativação e diferenciação dos eosinófilos (Abbas & Lichtman, 2008).

Grande parte das ações produzidas pela resposta imune *in situ* ocorre pela migração e proliferação celular e secreção de seus produtos. Para que tal fato aconteça, é necessária a ativação do endotélio vascular facilitando a adesão e diapedese de células imunes para o interior do tecido. A adesão de leucócitos circulantes para o endotélio vascular é um passo crítico para o extravasamento celular, durante a inflamação. Este processo é mediado pela molécula de adesão de E-selectina (CD62E), entre outras (Springer,1994). O aumento da expressão vascular desta molécula indica um processo inflamatório ativo.

A caracterização comparativa destes marcadores pode indicar tipos e intensidades de resposta inflamatória, com melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na reação imunológica durante a LTA.

## 2 JUSTIFICATIVA

A partir da observação clínica da ocorrência de resolução espontânea precoce, entre os casos de LCL diagnosticados no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, despertou-se o interesse para melhor entendimento deste fenômeno. Desta forma, foi elaborado estudo comparativo entre os dados clínicos, exames realizados na rotina diagnóstica e resposta imune *in situ*, entre os pacientes com forma típica de LCL que necessitaram de tratamento específico para obter a cura clínica (grupo LC) e os pacientes com leishmaniose com resolução espontânea precoce (grupo LRE). O fato da LRE ocorrer em alguns pacientes gera dúvidas em relação ao manejo clínico destes casos, suscitando a necessidade de padronização de condutas frente à sua ocorrência. Além disso, há reduzida quantidade de informação sobre fatores clínicos e imunológicos que influenciam no desfecho clínico destes pacientes.

Partindo do conhecimento prévio da importância da resposta imune celular *in situ* na evolução da lesão de LCL e na crescente possibilidade de manejo da resposta imune em imunoterapias coadjuvantes, é importante a caracterização dos fatores associados à evolução das lesões de LCL. Seria particularmente interessante identificar fatores que influenciam a evolução das formas cutâneas localizadas para resolução espontânea. Além do mais, a caracterização de possíveis marcadores do desenvolvimento da lesão pode, em médio prazo, levar ao desenvolvimento de novas formas de tratamento. Por último, a caracterização da arquitetura da resposta inflamatória *in situ* pode também indicar características que permitam o auxílio ao

diagnóstico presuntivo nos casos em que o agente etiológico não pode ser evidenciado e os indivíduos infectados têm história compatível com LCL ou outras infecções endêmicas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar parâmetros clínicos, laboratoriais e o perfil da resposta imune celular *in situ* de pacientes apresentando LCL, segundo a evolução clínica e a necessidade de tratamento específico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as características clínicas (tempo de evolução, número, aspecto, tamanho e localização das lesões) e sociodemográficas (gênero, idade, procedência, etc) entre os pacientes com resolução espontânea precoce e aqueles que foram submetidos a tratamento específico.

- Descrever os resultados dos exames laboratoriais por ocasião do diagnóstico [IDRM, sorologia para leishmaniose - reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e/ou ensaio imunoenzimático (ELISA) para *Leishmania*, cultura e *imprint* para *Leishmania*, exame histopatológico, PCR para *Leishmania*], nos pacientes com resolução espontânea precoce e naqueles submetidos a tratamento específico.

- Caracterizar a resposta imune celular *in situ* por imunohistoquímica nas lesões ativas de LCL comparando os resultados dos pacientes com resolução espontânea precoce com aqueles obtidos nos pacientes que necessitaram de tratamento específico.

- Associar os achados *in situ* com os dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SELEÇÃO DE PACIENTES

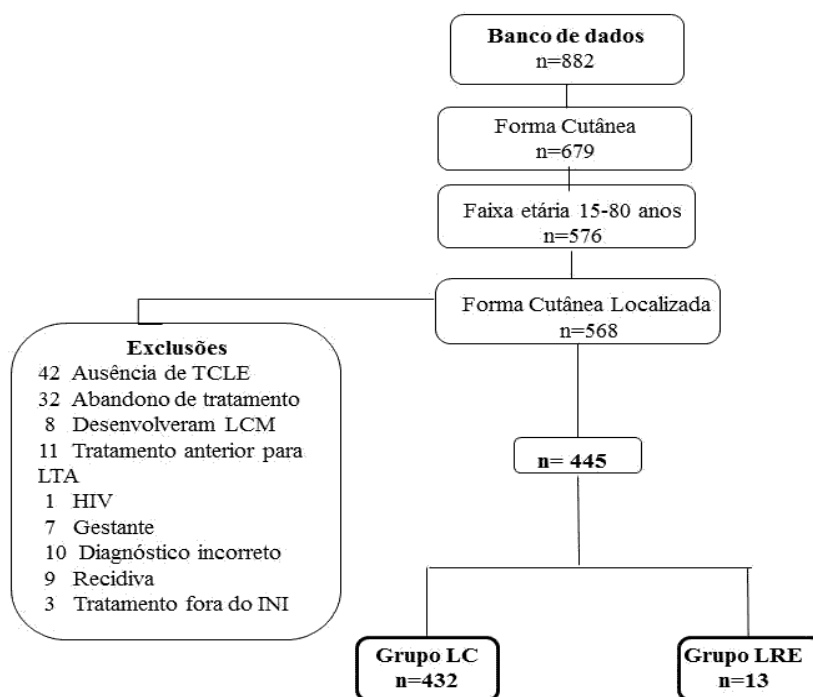
O estudo foi realizado com 445 pacientes, com faixa etária de 15 a 80 anos, com LTA na forma cutânea localizada (LCL), diagnosticados e acompanhados no ambulatório do LAPCLIN VIGILEISH do INI-FIOCRUZ, no Rio de Janeiro, no período de novembro de 2002 até dezembro de 2013.

Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido do projeto “Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INI/FIOCRUZ, sob número de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 0016.0.009.000-02 (Anexo 1). O projeto foi aprovado pelo CEP institucional sob o número de CAAE 19700413.6.0000.5262 (Anexo 2). Foi assinado um termo de confidencialidade pela aluna e orientadoras, que foi incluído no prontuário dos pacientes estudados (Apêndice).

O estudo foi dividido em duas etapas: na primeira (estudo clínico-laboratorial), além do grupo de resolução espontânea precoce, foram incluídos todos os pacientes submetidos a tratamento específico, no período de avaliação (Figura 2). Na segunda etapa (estudo imunológico *in situ*), foi realizado um estudo caso-controle com pareamento de todos os casos de LCL com resolução espontânea precoce com pacientes



submetidos a tratamento. A seleção de casos a partir do banco de dados encontra-se descrita no organograma a seguir. O número de casos variou em ambas as etapas.



**Figura 2.** Organograma 1. Características da seleção de casos avaliados no presente estudo. TCLE- termo de consentimento livre e esclarecido; LTA- leishmaniose tegumentar americana; HIV – vírus da imunodeficiência adquirida; LC- leishmaniose cutânea curada após tratamento; LRE- leishmaniose cutânea com resolução espontânea precoce; INI-Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

## 4.2 ETAPA 1: ANÁLISE CLÍNICA. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EM PACIENTES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA APRESENTANDO A FORMA CUTÂNEA LOCALIZADA, SUBMETIDOS À TERAPÊUTICA ESPECÍFICA E NAQUELES COM RESOLUÇÃO ESPONTÂNEA PRECOCE

Estudo retrospectivo realizado a partir da revisão de prontuários no INI-FIOCRUZ. Utilizou-se uma coorte de pacientes com idade acima de 15 e abaixo de 80 anos, com análise de todos os casos de LCL com resolução espontânea precoce e os casos de LCL submetidos a tratamento, atendidos no LAPCLIN VIGILEISH entre novembro de 2002 e dezembro de 2013, segundo critérios de inclusão/exclusão descritos a seguir.

Foram considerados casos de LCL, pacientes com quadro clínico compatível (procedência, tempo de evolução, sintomas associados e morfotopografia de lesão) e que obtiveram positividade em pelo menos um dos exames realizados (*imprint*, anátomo-patológico, PCR, cultura do fragmento, IDRM, sorologias para *Leishmania*). Nesta etapa, houve divisão dos pacientes em dois grupos: Grupo LRE- resolução espontânea precoce- cuja resolução das lesões ocorreu sem nenhum tratamento específico e; Grupo LC- pacientes que foram submetidos a tratamento específico (Figura 2).

Foi considerado caso de LRE o paciente com lesão epitelizada e sem crostas por ocasião da confirmação diagnóstica, que evoluiu para a cura completa das lesões sem necessidade de tratamento específico, bem como aquele que chegou ao INI com lesão

cicatrizada e/ou em processo de cicatrização e que também não necessitou de tratamento específico, em ambos os casos com positividade em pelo menos um exame parasitológico comprobatório da doença.

Foram excluídos pacientes com LTA cutânea com 10 ou mais lesões (definidos como forma cutânea disseminada); pacientes que, por qualquer motivo (recusa, nível de compreensão deficitário etc), não assinaram o TCLE, os menores de 15 anos e maiores de 80 anos, devido às alterações esperadas da resposta imune/terapêutica; aqueles que receberam tratamento anterior para LTA ou que estavam em uso de drogas imunossupressoras, gestantes, aqueles que receberam tratamento fora do INI ou que abandonaram o tratamento, os que apresentavam LM, casos de recidiva, bem como os portadores de doenças que alterassem o perfil imunológico, tais como: infecção pelo HIV, doenças autoimunes e hepatopatias graves que pudessem alterar o curso da doença (Figura 2).

Foram avaliados dados de características clínicas (tempo de evolução, número, aspecto, tamanho e localização das lesões), sociodemográficas (gênero, idade, procedência, etc) e de exames laboratoriais por ocasião do diagnóstico (IDRM, sorologia para leishmaniose - RIFI e/ou ELISA para *Leishmania*, cultura e *imprint* para *Leishmania*, exame histopatológico, reação em cadeia da polimerase para *Leishmania*).

Foi mantida a confidencialidade dos dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos para preservação de identidade por meio de formulário padronizado e codificado. O formulário utilizado objetivou avaliar variáveis sociodemográficas, dados sobre a história patológica pregressa dos pacientes, sintomas clínicos associados à LCL, uso de medicamentos (tópicos, orais), características das lesões (número, tempo de evolução e morfotopografia), exames laboratoriais e os prováveis desfechos encontrados (resolução espontânea precoce *versus* necessidade de tratamento específico). Neste

sentido, as datas do desfecho foram coletadas e comparadas às datas de cicatrização, segundo os grupos avaliados.

Denominou-se tempo de evolução da lesão o tempo decorrente entre surgimento da lesão cutânea e a primeira avaliação clínica (início do acompanhamento da coorte), em meses. Denominou-se tempo de epitelização o tempo decorrido entre a primeira avaliação do paciente até a epitelização completa da lesão, em dias. Denominou-se tempo de cicatrização o tempo decorrido entre a primeira avaliação do paciente até a cicatrização completa da lesão, em dias. Denominou-se tempo de acompanhamento como o tempo decorrido entre a primeira avaliação do paciente até sua última avaliação clínica, em dias.

#### **4.2.1 Análise estatística descritiva**

Os dados obtidos foram tabulados em banco de dados próprio e analisados para a detecção de possíveis diferenças entre os grupos avaliados. Utilizou-se o software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS Inc, EUA) versão 16.0 e R versão 2.15 (*R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*).

Medidas de tendência central e dispersão para as variáveis contínuas e medidas de proporção para as variáveis categóricas foram empregadas na análise exploratória dos dados. Foi realizada a análise das variáveis sociodemográficas (sexo, idade, procedência, etc), dados sobre a história patológica pregressa, sintomas clínicos, uso de medicamentos (tópicos, orais), características das lesões (número, tempo de evolução entre outros), exames laboratoriais (IDRM, sorologia para leishmaniose - RIFI e/ou ELISA para *Leishmania*, cultura e *imprint* para *Leishmania*, exame histopatológico, reação em cadeia da polimerase para *Leishmania*) e os prováveis desfechos encontrados.

As datas do desfecho (cura espontânea *versus* necessidade de tratamento) foram coletadas e comparadas ao tempo de cicatrização. A IDRM foi avaliada com relação ao seu maior diâmetro em negativa ( $< 5\text{mm}$ ) ou positiva ( $\geq 5\text{mm}$ ); além de se considerar os casos de positividade como fraco (5-9mm) ou forte reator ( $\geq 10\text{mm}$ ).

A associação das variáveis qualitativas segundo os grupos foi verificada pelo teste exato de Fisher.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade das variáveis contínuas. Devido à rejeição da normalidade, a comparação das variáveis contínuas segundo os grupos LRE e LC foi realizada pelo teste de Mann – Whitney.

As comorbidades clínicas (hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, cardiopatia e dislipidemia) e o uso de pelo menos um medicamento (antibiótico oral/tópico, hipoglicemiante, hipocolesterolêmico e antihipertensivo) foram analisados, após agrupamento das variáveis em categoria única.

P-valores $<0,05$  indicaram associações estatisticamente significantes.

#### **4.2.2 Análise de sobrevivência**

Utilizou-se a análise de sobrevivência para investigar fatores associados à resolução espontânea precoce, considerando-se o tempo até a ocorrência do desfecho ou censura. Como desfecho, considerou-se o evento “cura de lesão” e a análise, com base no tempo de cicatrização. O tempo foi analisado de forma contínua. Devido ao número de eventos, foi também utilizado a estimação de Nelson-Aalen, que porém não apresentou diferença na probabilidade de sobrevivência estimada. Os testes de Peto e/ou Log-rank foram utilizados para verificar se existia diferenças significativas entre o tempo de cicatrização de lesão dos grupos analisados. P-valores $<0.05$  indicaram testes

estatisticamente significantes. Utilizou-se o software R versão 2.15.

A interpretação das curvas de sobrevivência com diferenças significativas foi realizada pela comparação da ocorrência de eventos, representada pela probabilidade de sobrevivência em função do tempo até a cicatrização -  $S(t)$ . A probabilidade de sobrevivência representa o número de indivíduos que estão em risco de apresentar o evento de interesse (nesse caso, a cura clínica). Desta forma, quanto menor a probabilidade de sobrevivência mais eventos de interesse ocorreram no período.

#### 4.3 ETAPA 2: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA. ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE *IN SITU*. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE PARÂMETROS DE RESPOSTA IMUNE *IN SITU* EM PACIENTES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA APRESENTANDO A FORMA CUTÂNEA LOCALIZADA SUBMETIDOS À TERAPÊUTICA ESPECÍFICA, E NAQUELES COM RESOLUÇÃO ESPONTÂNEA PRECOCE.

Estudo caso-controle entre todos os pacientes de LCL com resolução espontânea precoce (casos; n= 12) que possuíam amostra de tecido criopreservado, e amostra de portadores de LCL que foram tratados de forma específica (controles; n=24). Os controles foram selecionados a partir do banco de dados da etapa 1 (análise clínica). O número de pacientes tratados foi o dobro do número de pacientes com resolução espontânea precoce da enfermidade (2 controles:1 caso). Os critérios de pareamento incluíram sexo, idade e localização das lesões. Após a aplicação do critério de sexo e localização de lesão semelhantes, selecionaram-se controles com faixa etária de até 5

anos acima e/ou abaixo de seu caso correspondente. A partir deste momento, o controle com idade mais semelhante ao caso foi escolhido.

Os critérios de exclusão foram os mesmos da etapa 1, acrescidos da ausência de condições de estudo *in situ* dos tecidos criopreservados (fragmento de tecido muito pequeno; sem a presença de epiderme e/ou derme).

### **4.3.1 Coleta de material biológico**

No momento do procedimento diagnóstico um fragmento de lesão foi obtido para os testes de imunohistoquímica. Este procedimento faz parte da rotina diagnóstica e não acarreta nenhuma manipulação adicional do paciente. Os fragmentos de biópsia criopreservados foram estocados em nitrogênio líquido no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Os dados clínicos laboratoriais e epidemiológicos dos 36 pacientes selecionados foram estocados em bases de dados com codificação dos pacientes, para preservação de identidade. Os resultados do estudo *in situ* foram avaliados em relação à evolução clínica e aos resultados dos exames laboratoriais por ocasião do diagnóstico, compreendendo sorologia para *Leishmania spp* (RIFI e ELISA), IDRM, cultura e *imprint* para *Leishmania spp*, além de exame histopatológico.

### **4.3.2 Preparação dos fragmentos teciduais**

Os fragmentos de tecido de lesão criopreservados em blocos de OCT (Tissue-Tek, USA) foram cortados em amostras de 3 µm de espessura (criostato Leica, Alemanha), apostos em lâminas de microscopia (*silanized slides*, DakoCytomation,

Dinamarca). Após a fixação em acetona pura análise (Merck, Alemanha), as lâminas foram usadas imediatamente para imunohistoquímica ou então armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para uso posterior.

### 4.3.3 Imunohistoquímica

As lâminas contendo cortes fixados foram secas à temperatura ambiente e depois hidratadas em PBS (solução de salina fosfatada tamponada) pH 7,4 – 7,6 por 10 minutos. A partir deste momento, todo o procedimento foi realizado em câmara úmida. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com soro de cabra normal, e após esta etapa um painel de anticorpos primários foi adicionado para a marcação de células e função celular nos infiltrados. Os anticorpos utilizados estão indicados na Tabela 1. Ao término da incubação os cortes foram lavados em PBS para retirada do anticorpo não fixado e as lâminas incubadas numa sequência de lavagens e incubações com anticorpo secundário biotinizado (Zymed Laboratories Inc., U.S.A), kit de marcação enzimática contendo streptavidina peroxidase (kit Dakocytomation) e kit de revelação AEC (Vector labs, USA). Por último, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer (Dako) e cobertas com solução de montagem (Dakocytomation) e lamínula. A leitura das lâminas em microscópio óptico (Nikon, Toquio, Japão) foi realizada pela contagem percentual das células marcadas, utilizando-se como padrão a contagem de 500 células ou 10 campos se necessário. Em alguns casos, utilizou-se lamínula milimetrada ou o programa Soft Imaging System (analySIS), para o cálculo do infiltrado inflamatório por  $\text{mm}^2$  de tecido como descrito por Morgado e cols, (2008). Os marcadores iNOS, E-selectina e TGF- $\beta$  foram verificados em 10 campos do microscópio (ampliação de 20X) e classificados como ausente (nenhuma área positiva por campo), discreto (pelo menos



uma área positiva por campo), moderado (duas ou três áreas positivas por campo), intenso (quatro ou cinco áreas positivas por campo) e muito intenso (mais de 5 áreas positivas por campo).

Para a detecção dos parasitos foi usado anticorpo primário de coelho anti-*Leishmania*, gentilmente cedido pela Dra. Maria de Fátima Madeira (INI-FIOCRUZ) e anticorpo secundário biotilado de cabra anti-imunoglobulina (Ig) de coelho. Todas as outras etapas foram idênticas às anteriores.

**Tabela 1.** Marcadores celulares e funcionais usado no estudo *in situ* por imunohistoquímica.

<b>Anticorpo anti</b>	<b>Fabricante</b> (procedência USA)	<b>Deteção</b>
CD4	Dako	Subpopulação CD4 de linfócitos T
CD8	Dako	Subpopulação CD8 de linfócitos T
CD22	Dako	Linfócitos B
Elastase neutrofílica	Dako	Neutrófilos
CD68	Dako	Macrófagos
CD69	Dako	Marcador de ativação celular
CD25	Dako	Receptor de IL-2 (interleucina 2)
CD62E	Dako	E-selectina – marcador de endotélio ativado
Ki-67	Dako	Marcador de proliferação celular
iNOS	T cell transduction	Enzima óxido nítrico sintase (produção de óxido nítrico)
IFN- $\gamma$	Pharmingen - BD	Citocina - Interferon gama (resposta de tipo 1)
IL-10	Pharmingen - BD	Citocina – interleucina 10 (regulador da resposta imune)
TGF- $\beta$	Pharmingen - BD	Citocina – fator de crescimento de células T (ligado à regulação da inflamação e processo de reparo tecidual)
ST2L	Bioscience - BD	Marcador de receptor de superfície presente em populações com função reguladora responderas a IL-33
FoxP3	Bioscience - BD	<i>Forkhead Box P3</i> - marcador expresso em células T regulatórias
CD56	DAKO	Células NK
Granzima B	kamyia	Enzima presente no grânulo citotóxico de CD8 e NK
Arginase	Hycult	Antagonista de NOS2
IL-17	BD Bioscience	Citocina próinflamatória subpopulação Th17
IL-5	BD Bioscience	Citocina antiinflamatória Th2
IL-33	BD Bioscience	Citocina de regulação

#### 4.3.4 Análise estatística da etapa 2

Foi construído banco de dados específico para o estudo *in situ* utilizando-se o software SPSS versão 16. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade das variáveis contínuas. Foi realizada análise descritiva com medidas de tendência central e dispersão para as variáveis contínuas e medidas de proporção para as variáveis categóricas. A verificação dos resultados de imunohistoquímica foi realizada pela análise de amostras não pareadas (teste não paramétrico de Mann–Whitney) para comparação de lesões do grupo LRE com aquelas ditas típicas.

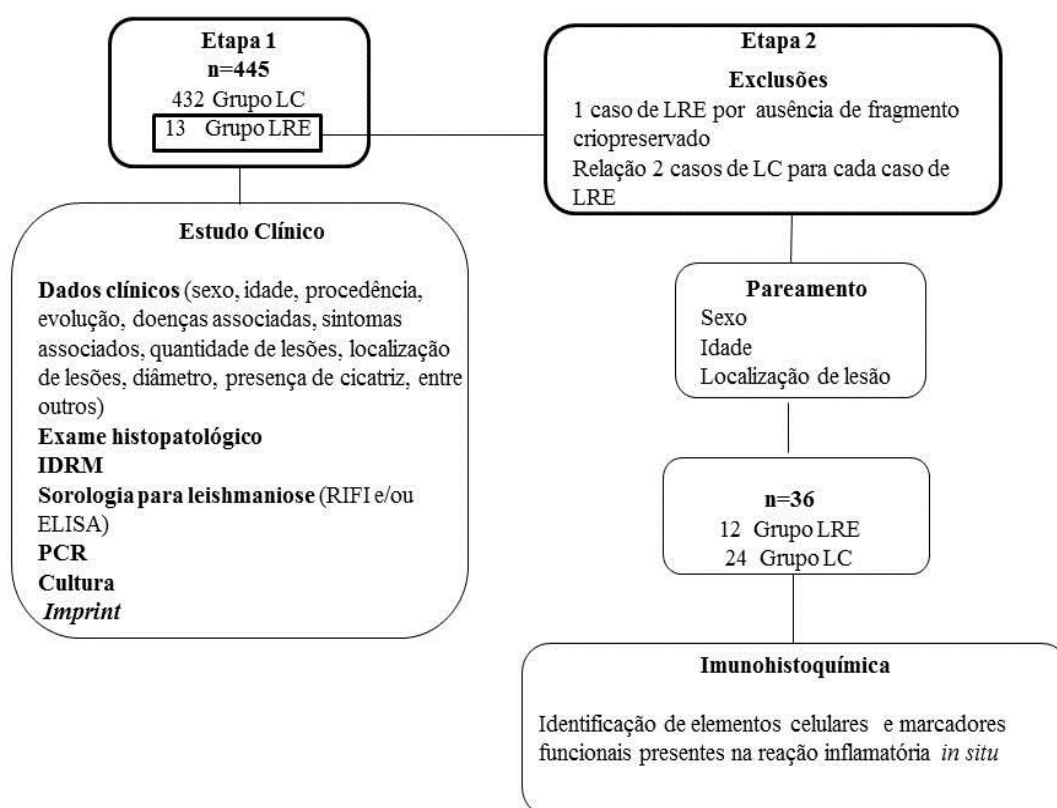
Foram comparados os parâmetros clínicos e os resultados de exames laboratoriais, inclusive os resultados dos estudos imunológicos *in situ*, utilizando-se a correlação por postos de Spearman, quando aplicável.

Valores mais próximos de  $\pm 1$  indicaram correlação linear mais intensa. A direção da correlação é indicada pelo sinal (positiva ou negativa).

P-valores < 0,05 indicaram associações estatisticamente significantes.

## 5 RESULTADOS

Como indicado na seção de material e métodos, o estudo foi realizado em duas etapas, cujos passos estão indicados na Figura 3.





**Figura 3.** Organograma 2. Seleção dos grupos de estudo das etapas 1 (estudo clínico laboratorial) e 2 (resposta imune *in situ* por imunohistoquímica). LC- leishmaniose cutânea curada após tratamento; LRE- leishmaniose cutânea com resolução espontânea precoce; IDRMs- intradermorreação de Montenegro; RIFI- reação de imunofluorescência indireta; ELISA- ensaio imunoenzimático; PCR- reação em cadeia pela polimerase.

## 5.1 ETAPA 1. AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS NOS GRUPOS ESTUDADOS

A partir dos resultados da primeira etapa, foi elaborado um artigo científico, submetido para publicação em revista indexada. O artigo apresenta uma comparação dos dados clínicos, laboratoriais e evolutivos entre pacientes com LRE e aqueles com LCL que apresentaram necessidade de tratamento específico.

### Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *British Journal of Dermatology*.

<p><b>Manuscript ID:</b> BJD-2015-0911</p> <p><b>Title:</b> Clinical and laboratory profiles of patients with early spontaneous healing in cutaneous localized leishmaniasis.</p> <p><b>Authors:</b> Oliveira-Ribeiro, Carla Pimentel, Maria Inês Oliveira, Raquel Fagundes, Aline Madeira, Maria de Fátima Mello, Cintia Mouta-Confort, Eliame Valete-Rosalino, Claudia Maria Vasconcellos, Érica Lyra, Marcelo Quintella, Leonardo Antonio, Lilians Schubach, Armando Conceição-Silva, Fatima</p> <p><b>Date Submitted:</b> 14-May-2015</p>
<p> Print  Return to Dashboard</p>

## 5.1.2 Artigo científico

### Clinical and laboratory profiles of patients with early spontaneous healing in cutaneous localized leishmaniasis.

#### ABSTRACT

**BACKGROUND:** Skin ulcers in American cutaneous leishmaniasis (ACL) may heal spontaneously after months / years. However, few cases may present quick heal even during diagnosis procedure (early spontaneous healing- ESH). **OBJECTIVES:** To compare ESH patients with cases requiring specific treatment (CL). **METHODS:** A cohort study of ACL patients (n=445) were divided into 2 groups: ESH – spontaneously healed patients (n = 13; 2.90%), and CL - treated patients (n = 432; 97.10%). We compared clinical and laboratorial findings at diagnosis, including the lesion healing process. **RESULTS:** ESH patients had a higher percentage of single lesions (p = 0.027), scar on initial examination (p = 0.001), lesions located in the dorsal trunk (p = 0.017), besides earlier healing (p <0.001). CL presents higher frequency of ulcerated lesions (p = 0.002), amastigotes identified in histopathology exams (p=0.005), positive cultures (p = 0.001), and higher positivity in  $\geq 3$  parasitological exams (p=0.030). All ESH cases were positive in only a single exam, especially in PCR. **CONCLUSION:** The results suggest lower parasite load in ESH cases, which would facilitate infection control. The absence or deficiency of specific treatment is commonly identified as predisposing factors for recurrence and metastasis in ACL. However, due to the drugs toxicity, the treatment of cases which progress to early spontaneous healing is controversial. ESH patients were followed for up to 5 years after cure, with no evidence of recrudescence, therefore suggesting that not treating these patients is justifiable, but periodic dermatological and otorhinolaryngological examinations are advisable to detect a possible relapse.

**KEY WORDS:** American tegumentary leishmaniasis, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Clinical cure, Spontaneous healing, Diagnosis.

## INTRODUCTION

Leishmaniasis comprises a group of infectious diseases that may occur with cutaneous or visceral involvement. They are caused by protozoa of the genus *Leishmania* transmitted to humans by infected female sandflies. American cutaneous leishmaniasis (ACL), cutaneous leishmaniasis in the New World, clinically presents quite variable lesions, from the acneiform type to ulcers with or without lymphadenopathy. The typical cutaneous lesion is an ulcer (usually a single one) with infiltrated borders in exposed areas of the body, but clinical presentation may vary depending on the immune status of the host, the parasite load, and the involved *Leishmania* species<sup>1</sup>. Treatment is indicated in confirmed cases but the recommended drugs are quite toxic<sup>2-4</sup>, and in recent years cases of resistance have been described<sup>5-8</sup>.

The typical ulcer of cutaneous leishmaniasis can progress to cure over a period of several months to years, if not diagnosed and treated<sup>9</sup>. However, some patients have early spontaneous resolution of the disease; they are diagnosed according to clinical and laboratory criteria and, before the start of drug therapy, the lesions begin the process of clinical cure, and may not require treatment<sup>10,11</sup>.

The Leishmaniasis Surveillance Laboratory (LAPCLIN VIGILEISH) at Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, receives patients with suspected ACL from the state of Rio de Janeiro and from other regions of Brazil. Patients with early clinical signs of healing without specific treatment and those treated are invited to participate in a follow-up of at least 5 years with dermatological and otorhinolaryngological annual exams, creating conditions for prompt identification of signs of recurrence of skin lesions and / or development of mucosal involvement. This study allowed the comparison of clinical,

laboratory and follow-up data of the leishmaniasis patients with early spontaneous healing with those of the patients that needed specific treatment.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Group formation and ethical considerations*

This is a cohort study of 445 patients with cutaneous leishmaniasis attended at LAPCLIN VIGILEISH from November, 2002 to December, 2013. This study was approved by the Ethics Committee of INI / Fiocruz under number 19700413.6.0000.5262. All participants signed an informed consent form. Patients under 18 had the informed consent form signed by parents or guardians who accompanied them during all procedures.

Diagnosis of ACL through clinical (medical history, morphology and topography of skin lesion, and compatible evolution time prior to the diagnosis) and epidemiological (origin and age) data and / or parasitological confirmation were considered as inclusion criteria.

Patients were classified into one of two groups: ESH - patients with clinical and laboratory diagnosis of cutaneous leishmaniasis with early spontaneous healing (n = 13); CL - patients with typical cutaneous leishmaniasis requiring specific treatment (n = 432) (Fig. 1).

An ESH case was defined as a patient with a positive parasitological exam for *Leishmania* spp. and epithelized lesion(s) without crusts in the period between the laboratory investigation for the disease diagnosis and the expected date for the start of the specific treatment.

We excluded patients with 10 or more lesions, those who did not sign the informed consent form, those who have received prior treatment for ACL or that

abandoned treatment, those who were using immunosuppressive drugs, patients with diseases with altered immune profiles (such as HIV infection), pregnant women, and patients with mucosal forms at diagnosis.

#### *Evaluation of the clinical and laboratory profiles of the patients*

All patients underwent clinical, dermatologic, otorhinolaryngological and laboratory evaluation, the last one comprising the following tests to confirm the diagnosis: Montenegro skin test (MST); serology [indirect immunofluorescence assay (IFA) and / or immunoenzymatic assay (ELISA)]; culture, imprint, histopathology, polymerase chain reaction (PCR) and anti-*Leishmania* immunohistochemistry (IHC) with fragments of the cutaneous lesion. MST was evaluated with respect to its largest diameter, as negative (<5 mm) or positive ( $\geq 5$  mm). Patients had clinical (dermatological and otorhinolaryngological) and laboratory (serology for *Leishmania* spp.) examinations annually for up to five years.

Analysis considered sociodemographic variables (sex, age and origin); use of non-specific medications (oral / topic antibiotics, hypoglycemics, antihypertensive and hypocholesterolemic drugs); data on past medical history including clinical comorbidities (hypertension, diabetes mellitus, heart disease, dyslipidemia, among others); characteristics of the lesions (number, duration, size, morphology and topography); results of laboratory tests; and the outcomes of spontaneous healing or need for specific treatment.

#### *Comparative analysis of the clinical and laboratory profiles of the patients*

The softwares Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc, USA) version 16.0, and R version 2.15 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna,



Austria) were used. Data were descriptively analyzed using frequency for categorical variables; and median, minimum and maximum for continuous variables. The association of qualitative variables according to the groups was assessed using Fisher's Exact test. The Kolmogorov-Smirnov test indicated rejection of the normality of the continuous variables. The comparison of continuous variables in ESH and CL groups was performed using the Mann-Whitney test.

We used survival analysis to investigate differences in healing time of the cutaneous lesion between the studied groups, considering the time until the occurrence of the outcome or censoring. The event "clinical cure of lesion" was considered the outcome, and defined as epithelized lesion(s) without crusts. Censoring was applied when the outcome was not observed at the end of the follow-up period. ESH and CL patients with missing data in the medical records regarding time to heal were excluded from the survival analysis (n =10); therefore, 9 patients from the ESH group and 426 patients from CL were included in this analysis. We performed the analysis based on the healing time (total time elapsed between the date of the first medical visit and the date of the complete healing of the lesion). The non-parametric method of Kaplan-Meier allowed the analysis of probabilities for survival over time. Peto and / or Log-rank tests were used to check for differences between the stratified survival curves.

P-values <0.05 indicated statistically significant tests.

## **RESULTS**

Four hundred and forty-five patients were analyzed, with a median age of 37 (15-80) years, and 63.40% were men. Most patients (64.50%) came from the state of Rio de Janeiro (Brazil).

Considering all the studied cases, 64.70% of the patients had a single lesion. Lesions affected different sites of the body: exclusive on the lower limbs (35.10%); exclusive on the upper limbs (30.10%); restricted to regions of head and trunk (21.80%); and multiple locations (13.00%). The presence of ulcers was prevalent at diagnosis ( $n = 394$ ; 88.50%), but in 9 cases scars were observed in the initial clinical examination (2.00%). The median of the largest diameter of the lesions was 30 mm (4-120 mm). The median MST measure was 17 mm (2-71 mm), and 82.50% of the patients were considered positive in this exam. The median time of progression of the lesion previous to diagnosis was 60.87 days; and the median follow-up period was 803 days.

Four hundred and thirty-two patients (97.10%) were treated for ACL, while in thirteen individuals (2.90%) the spontaneous healing phenomenon was observed. In the CL group, 430 patients were treated with meglumine antimoniate (99.53%), and 2 cases were treated with amphotericin B deoxycholate (0.47%).

The median time to lesion healing was lower in the ESH group (35 days) compared to the CL group (77 days),  $p = 0.001$ . Patient characteristics according to the outcomes of spontaneous resolution or need for specific treatment are shown in Table 1.

When compared with the CL group, the ESH group showed a higher percentage of single lesions ( $p = 0.027$ ) and scars ( $p = 0.001$ ). In 30.80% of the patients in the ESH group the lesion was located in the dorsal trunk, and this was observed in 7.60% of the cases in CL group ( $p = 0.017$ ). There were no significant differences between the median times to wound healing in patients who healed spontaneously with lower limb injuries and those with lesions in other locations,  $p = 0.534$ .

In the CL group, there was a predominance of ulcerated lesions (89.60%,  $p = 0.002$ ), the finding of amastigotes in the histopathological exam (62.60%,  $p = 0.005$ ), and positive culture (84.60%,  $p = 0.001$ ). Most of these patients had a single lesion on

the lower limbs (42.90%). In this group, the mean time to healing of the lesions in the lower limbs (237 days) was higher than that of lesions at other locations (201 days),  $p = 0.012$ .

Table 2 reveals the higher positivity in confirmatory parasitological tests (culture, imprint, PCR and finding of amastigotes in histopathological exams or anti-*Leishmania* immunohistochemistry [IHC]) in the CL group. Fifty-eight point eight percent of these patients were positive in 3 or more tests, while in the ESH group all cases were positive in only 1 confirmatory exam ( $p = 0.030$ ). Noteworthy is the number of patients in the ESH group positive only in the PCR ( $n = 5$ ; 38.46%).

The occurrence of clinical cure of the lesion according to the healing time was evaluated through the Kaplan-Meier method (Fig. 2). In all cases of spontaneous healing analyzed by this method ( $n = 9$ ), wound healing occurred within approximately 3 months (91 days). Ten subjects with prolonged follow-up (at least 256 days), all belonging to the CL group, were censored at the end of the study without presenting the event of interest (healed lesion). There was a statistically significant difference between the groups using the Kaplan-Meier method, evidenced by Peto and Log-rank tests ( $p$ -values  $< 0.001$ ). Thus, the ESH group showed earlier clinical cure during the observation period.

None of the 13 ESH cases presented recurrence of the skin lesions or mucosal involvement during the follow up period. From the 432 patients in the CL group, 23 relapsed (5.32%) and 11 showed mucosal lesions (2.54%) in follow up.

## DISCUSSION

The diagnosis of ACL in the cases of early spontaneous healing evaluated in this study was confirmed by the identification of the parasite through one of the used parasitological methods. This allowed a study of cases of ACL with spontaneous resolution compared with those who needed specific treatment for the healing of their cutaneous lesions.

The cases of the ESH group had the highest percentage of single lesions and fewer ulcerated lesions in the initial assessment, and they had less positive results in the confirmatory parasitological tests, differences that were significant in relation to the CL group. Furthermore, a higher positivity for the presence of parasites by histopathology and culture when the treatment was required was demonstrated, plus a greater percentage of strong reactors in MST. In medical literature, the sensitivity rates of histopathology and isolation in culture medium varies widely<sup>12-14</sup>, but the presence of higher parasite loads enhances its detection and thus the parasitological confirmation of the case.

The number of cases of ESH positive only in PCR indirectly suggests that the parasite load tends to be lower in these patients, indicating a balance between the host inflammatory process and the parasite load. A most effective infection control would lead to spontaneous healing. As a result of the probable ability to control the parasite load and the inflammatory process, the cases of ESH had a lower average healing time than that observed in the CL group. Moreover, the findings suggest that the higher parasite loads in the CL patients would exert pressure on the inflammatory response, leading to stimulation of the maintenance of the activity of the inflammatory process, which slows its control and subsequently the wound healing. The involvement of the

inflammatory response in the formation and maintenance of the leishmaniasis lesions has been demonstrated in a murine model<sup>15</sup>. In humans, although significant difference has not been demonstrated between the amount of the type 1 cytokine interferon gamma (IFN $\gamma$ ) in the peripheral blood of patients with cutaneous leishmaniasis cured after treatment and in the cases with spontaneous healing, in the last ones there was a tendency to higher values<sup>16</sup>. The balance between type 1 and type 2 immunological responses has been suggested as determinant in the evolution of ACL for self-limited or severe forms<sup>17,18</sup>.

The need for specific treatment and the response to the antimonial therapy have been the focus of discussions. Studies in Latin America show significant differences in cure rates with pentavalent antimony (PA)<sup>3,6,8,19-21</sup>. It has also been reported that early treatment of ACL does not prevent the development of ulcers<sup>22,23</sup> and is associated with higher treatment failure rates<sup>23</sup>. Short evolution times prior to treatment and weak positive MST were both associated with treatment failure<sup>24</sup>. Other factors have also been found to be able to influence the therapeutic response to PA. Among them we can mention the species of the involved parasite, comorbidities, presence of three or more lesions, body weight above sixty-eight kilograms and the irregularity of treatment<sup>5, 25-30</sup>. However, the use of second choice drugs has not shown greater efficacy, or even lower rate of adverse effects. The high toxicity of PA and the increasingly described treatment failure rates has put into discussion the directions for the treatment of ACL.

Criteria for cure, which are essentially clinical, vary according to different authors. This could influence the wide variation in the evaluation of the success of PA therapy. When there is evidence of progression to healing, the extension of the follow up without re-treatment for up to six months is suggested<sup>31,32</sup>. Therefore we may question the need to propose specific treatment in cases with evidence of progression to

early spontaneous healing. Many authors indicate the treatment even in cases of spontaneous regression of the lesions, due to the potential capacity of development of secondary metastatic lesions, especially to mucous membranes, in cases of infection with *L. (V.) braziliensis*<sup>31,33</sup>. Mucosal leishmaniasis (ML) occurs in a small proportion (3 to 5%) of the ACL cases in Brazil, and can occur several years after the healing of the primary lesion<sup>34</sup>. It is mainly attributed to hematogenous metastases<sup>35</sup>. However, some of these cases share no history of prior cutaneous lesions, and ML is then considered of indeterminate origin<sup>36</sup>. Spontaneous cures and irregular treatments have been considered risk factors for the emergence of ML<sup>10,36</sup>. However, thorough and longer term follow-up studies are needed. Moreover, in our study, ESH patients did not receive any specific treatment, and yearly follow up of approximately 5 post-treatment years did not show any sign of relapse of skin lesions or the appearance of even incipient mucosal lesions in these patients.

Some authors demonstrated that ACL lesions located in the lower limbs needed more time to heal<sup>38</sup>; however, there were greater proportions of healed lesions in this location<sup>13</sup>. Our results also showed that lesions in the lower limbs in treated patients demanded higher healing time than lesions in other locations. Location in the dorsal part of the trunk most rapidly evolved into healing in all patients, and was more often observed in patients with spontaneous resolution. The location in the lower limb did not appear to influence the healing time in patients with early spontaneous healing.

In conclusion, our results suggest that cases of ACL with progression to early spontaneous healing have an apparently lower parasite load evidenced by the difficulty of parasitological diagnosis during the investigation of the case, since most of them were positive only in the PCR. Whether this is due to an inoculation of a lower number of parasites during the sandfly bite(s) or a more efficient immune response of the

infected persons cannot be defined up to now. Due to obvious signs of healing of the lesions we chose not to initiate specific treatment, since leishmanicidal drugs have great potential for toxicity. Even so, healing of lesions demanded less time than in patients who required treatment. It must be highlighted that even after a long period of follow up post-regression of the lesions, none of the ESH studied cases studied developed recurrence of the lesions or mucosal damage.

The cases of patients with spontaneous resolution in ACL are a challenge in clinical practice. Dermatological / otorhinolaryngological periodic examination of these patients, as well as clear guidance to patients about the signs and symptoms of mucosal lesions are recommended to detect the slight possibility of a relapse.

## REFERENCES

1. Silveira FT, Lainson R, Corbett C. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; **99**:239-51.
2. Hepburn N, Tidman M, Hunter J. Aminosidine (paromomycin) versus sodium stibogluconate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; **88**:700–703.
3. Deps PD, Viana MC, Falqueto A, Dietze R. Avaliação comparativa da eficácia e toxicidade do antimoniato de N-metil-glucamina e do estibogluconato de Sódio BP88© no tratamento da leishmaniose cutânea localizada. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; **33**: 535–43.
4. Lima MVN, Oliveira RZ, Lima AP, et al. Leishmaniose cutânea com desfecho fatal durante tratamento com antimonial pentavalente. *An Bras Dermatol* 2007; **82**: 269 - 71.
5. Palacios R, Osorio LE, Grajalew LF, Ochoa MT. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonite for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia* species. *Am J Trop Med Hyg* 2001; **64**: 187–93.
6. Andersen EMC-SM, Llanos-Cuentos A, Luz-Cjuno M, et al. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for perureian cutaneous leishmaniasis. *J Trop Med Hyg* 2005; **72**: 133–137.
7. Bermudez H, Rojas E, Garcia L, et al. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. *Ann Trop Med Parasitol* 2006; **100**: 591–

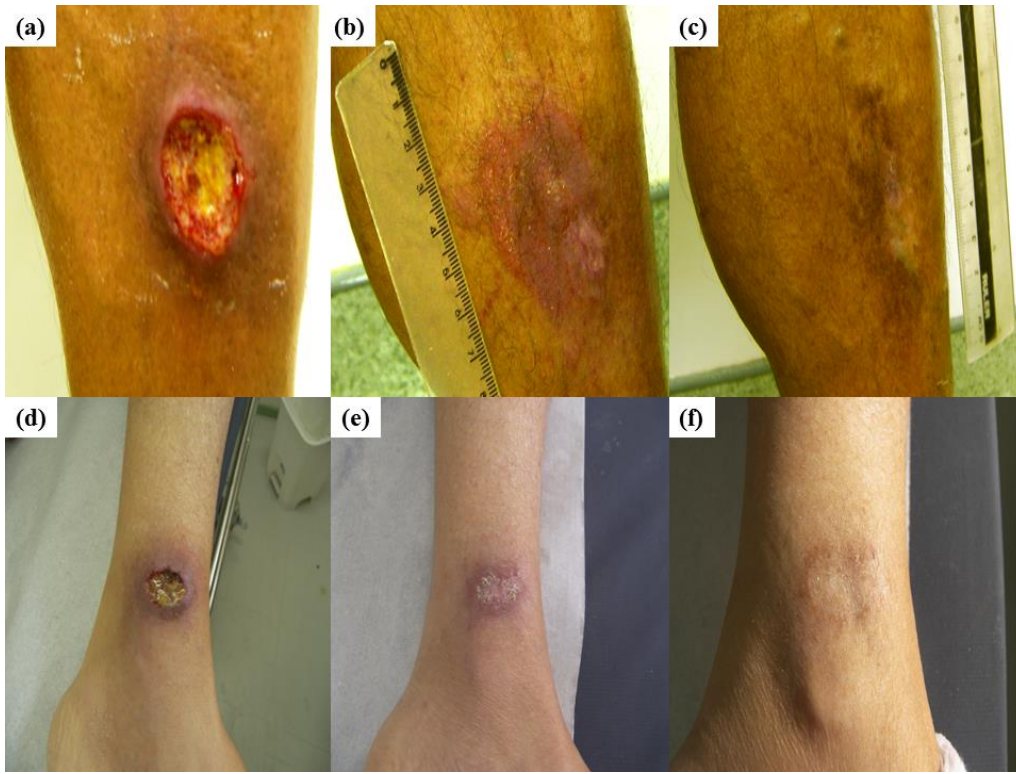
600.

8. Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis* 2008;**46**: 223–31.
9. World Health Organization. Technical Report Series 949. Control of the leishmaniasis. Geneva, 2010, 186 p.
10. Marsden PD, Tada MS, Barreto AC, Cuba CC. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; **78**: 561-2.
11. Costa JML, Vale KC, França F, et al. Cura espontânea da leishmaniose causada por *Leishmania viannia braziliensis* em lesões cutâneas. *Rev Soc Bras Med Trop* 1990; **23**: 205-8.
12. Furtado T. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol* 1980; **55**: 81-86.
13. Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO. 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* 2001; **65**: 456- 65.
14. Amato VS, de Andrade HF, Duarte M. Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop* 2003; **85**: 39– 49.
15. Belkaid Y, Stebut EV, Mendez S, et al. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 2002; **168**:3992-4000.
16. Gomes-Silva A, de Cássia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, et al. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* 2007; **149**:440-4.
17. Awasthi A, Mathur, RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 2004; **119**: 238-58.
18. Gollob KJ, Antonelli LRV, Faria DR, et al. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int Immunopharmacol* 2008; **8**:1338–43.
19. Arana BA, Navin TR, Arana FE, et al. Efficacy of a short course (10 days) of high-dose meglumine antimonate with or without interferon-gamma in treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Clin Infect Dis* 1994; **18**: 381–4.
20. Armijos RX, Weigel MM, Calvopina M, et al. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2004; **91**: 153–160.
21. Oliveira-Neto MP, Mattos MS. An alternative antimonial schedule to be used in cutaneous leishmaniasis when high doses of antimony are undesirable. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; **39**: 323–6.
22. Machado P, Araujo C, Da Silva AT, et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 69-73.
23. Unger A, O’Neal S, Machado PRL, et al. Association of Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis Prior to Ulcer Development with High Rate of Failure in Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2009; **80**: 574-9.
24. Antonio LF, Fagundes A, Oliveira RV, et al. Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2014; **56**: 375-380.
25. Berman JD, Chulay JD, Hendricks LD, Oster CN. Susceptibility of clinically

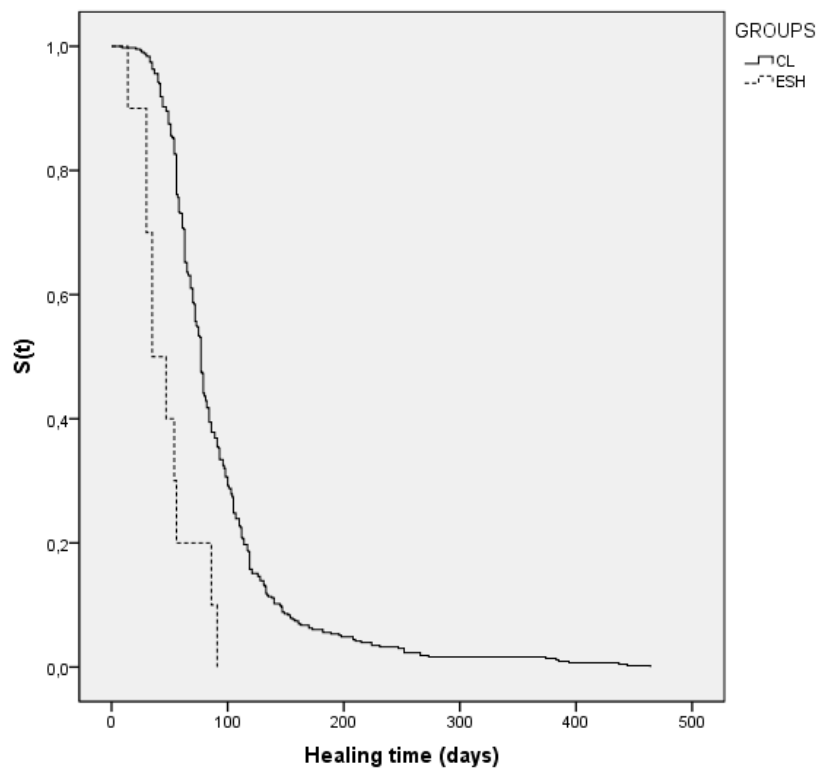


- sensitive and resistant *Leishmania* to pentavalent antimony *in vitro*. *Am J Trop Med Hyg* 1982; **31**: 459–65.
26. Arevalo I, Ward B, Miller R, et al. Successful treatment of drug resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 1847–51.
27. Brochu C, Wang J, Roy G, et al. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3073–9.
28. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003; **19**: 502–8.
29. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**: 111–26.
30. Rodrigues M, Hueb M, Santos T, Fontes CJ. Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; **39**: 139–145.
31. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed atualizada: Ministério da Saúde. 2010:180p.
32. Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, et al. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg* 1997; **57**: 651-5.
33. Berman JD. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1996; **14**: 519-22.
34. Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983;**77**:569-596.
35. Llanos-Cuentas EA, Arana M, Cuba CAC, et al. Leishmaniasis cutanea diseminada asociada a metastasis en mucosas, causada por *Leishmania braziliensis braziliensis*: fracaso en el hallazgo de parasitos circulantes. *Rev Soc Bras Med Trop* 1985; **18**: 271-272.
36. Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Lago EL, et al. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia - Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. III: Mucosal disease presentation and initial evolution. *Rev Soc Bras Med Trop* 1984;**17**:179-186.
37. Schubach AO, Marzochi KBF, Moreira JS, et al. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; **38**:213-217.
38. Azeredo-Coutinho RB, Mendonça SC, Callahan H, et al. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *J Parasitol* 2007; **93**: 688-93.

## FIGURES



**Figure 1.** American cutaneous leishmaniasis (ACL), typical skin lesion: (a) Pretreatment. (b) epithelialization. (c) Wound healing. ACL, early spontaneous healing (d) Before diagnosis. (e) Epithelialization. (f) Healing.



**Figure 2.** Kaplan-Meier curve; 435 patients with American cutaneous leishmaniasis according to treatment (CL) / no treatment (ESH) groups and healing time. Continuous line - CL Group: patients with cutaneous leishmaniasis who undergone specific treatment. Dashed line - ESH group: patients with early spontaneous healing. p-value <0,001- INI / Fiocruz, 2002-2013.

**Table 1.** Distribution of the characteristics of 445 patients with cutaneous leishmaniasis according to the need for treatment (CL) or no treatment (ESH), INI / Fiocruz, Brazil (2002-2013).

Variable	Status	Treatment / No treatment				p-value*
		CL		ESH		
		n	%	n	%	
<i>SOCIODEMOGRAPHIC VARIABLES</i>						
<b>Sex</b>	Male	277	64.1	5	38.5	0.057
	Female	155	35.9	8	61.5	
<b>Age group</b>	15 - 30 years	150	34.7	5	38.5	0.877
	> 30 years	282	65.3	8	61.5	
<b>Comorbidities</b>	Yes	115	26.6	2	15.4	0.291
	No	317	73.4	11	84.6	
<b>Medications</b>	Yes	275	63.7	7	53.8	0.327
	No	157	36.3	6	46.2	
<i>CHARACTERISTICS OF THE LESIONS</i>						
<b>Number of lesions</b>	1	276	63.9	12	92.3	<b>0.027</b>
	2 or more	156	36.1	1	7.7	
<b>Larger diameter of the lesion (mm)</b>	4--26	167	39.2	6	50.0	0.320
	≥ 27	259	60.8	6	50.0	
<b>Ulcer</b>	Yes	387	89.6	7	53.8	<b>0.002</b>
	No	45	10.4	6	46.2	
<b>Scar</b>	Yes	5	1.2	4	30.8	<b>0.001</b>
	No	427	98.8	9	69.2	
<b>Location at the dorsal aspect of the trunk</b>	Yes	33	7.6	4	30.8	<b>0.017</b>
	No	399	92.4	9	69.2	
<b>MST with bullous reaction</b>	Yes	10	2.3	2	15.4	<b>0.044</b>
	No	422	97.7	11	84.6	
<i>LABORATORY EXAMS</i>						
<b>MST</b>	Positive	355	95.7	12	92.3	0.450
	Negative	16	4.3	1	7.7	
<b>IFA</b>	Positive	278	80.4	6	66.7	0.260
	Negative	68	19.6	3	33.3	
<b>ELISA</b>	Positive	341	90.0	9	90.0	0.736
	Negative	38	10.0	1	10.0	
<b>CULTURE</b>	Positive	341	84.6	1	9.1	<b>0.001</b>
	Negative	62	15.4	10	90.9	
<b>IMPRINT</b>	Positive	133	42.1	1	11.1	0.142
	Negative	183	57.9	8	88.9	
<b>PCR</b>	Positive	124	86.1	5	62.5	0.102
	Negative	20	13.9	3	37.5	
<i>HISTOPATHOLOGY</i>						
<b>AMASTIGOTES</b>	Yes	266	62.6	3	23.1	<b>0.005</b>
	No	159	37.4	10	76.9	
<i>IMMUNOHISTOCHEMISTRY</i>						
<b>AMASTIGOTES</b>	Yes	12	50.0	3	25.0	<b>0.038</b>
	No	12	50.0	9	75.0	

\* p- value <0.05 indicates significant association in the Fisher exact test;

CL - cutaneous leishmaniasis cured after treatment; ESH - patients with early spontaneous healing of the lesions without specific treatment;

MST – Montenegro skin test; IFA- indirect immunofluorescence assay; ELISA - enzyme immunoassay; PCR - polymerase chain reaction;

**Bold** significant p-values

**Table 2.** Positivity in confirmatory exams\* of 445 patients with localized cutaneous leishmaniasis. INI / Fiocruz (2002-2013).

Number of positive tests	Treatment / No treatment				p-value
	CL		ESH		
	n	%	n	%	
<b>1-2</b>	35	41.2	13**	100	<b>0.030</b>
<b>3-4</b>	50	58.8	0	0	

CL – Group of treated patients

ESH - Group of patients with early spontaneous healing

Bold - significant p-value

\* Imprint; culture; PCR; amastigote in histopathology and /or in anti-*Leishmania* immunohistochemistry

\*\* All 13 patients were positive in a single confirmatory test

## 5.2 ETAPA 2. ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE *in situ* NOS GRUPOS ESTUDADOS

### 5.2.1 Resultados

Tecidos oriundos de lesões ativas dos pacientes com forma cutânea típica que foram posteriormente submetidos a tratamento específico (grupo LC) e de resolução espontânea precoce (grupo LRE) foram analisados pela técnica de imunohistoquímica, como descrito na seção de material e métodos.

Dos 12 pacientes do grupo LRE, 7 eram do sexo feminino (58,34%) e 5 do masculino (41,66%), com idade variando entre 17 e 65 anos (mediana 33,50 anos). Entre os 24 pacientes do grupo LC, 14 eram mulheres (58,53%) e 10 homens (41,67%), com idade variando entre 18 e 63 anos (mediana 36,20 anos). Não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos em relação à distribuição por sexo e idade, o que permitiu a comparação de dados.

A IDRMM foi positiva em 91,7% do grupo LRE, com mediana de 14,0 mm (variação de 3,0 a 45,0 mm), em comparação com os casos de LC que tiveram 66,7% de positividade e mediana de 18,0 mm (variação de 2,0 a 49,0 mm, p-valor = 0,233). Todos os casos do grupo LRE tiveram confirmação parasitológica (*imprint*, PCR, cultura ou imunohistoquímica anti-*Leishmania*). A análise do tempo mediano de evolução antes do diagnóstico foi de 2 meses (variação de 1 a 3 meses), para o grupo LRE; e de mediana de 3 meses (variação de 1 a 18 meses) para o grupo LC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, p-valor = 0,647.

Comparando-se a localização das lesões entre os grupos, percebeu-se uma

predominância de lesões nos membros inferiores em ambos, não havendo diferenças significativas entre eles.

A Tabela 2 sumariza os achados obtidos no exame anatomopatológico dos pacientes incluídos no estudo *in situ*.

**Tabela 2.** Achados no exame anatomopatológico de 36 pacientes com LTA apresentando cura espontânea precoce ou após tratamento.

<b>Grupos</b>		PIG	PIC	PIG+PIC	Ama+DIF	Ama+PIG
<b>LRE</b>	n	4	2	3	0	3
(N=12)	(%)	33,33	16,67	25,00	0	25,00
<b>LC</b>	n	11	3	3	2	18
(N=24)	(%)	29,73	8,11	8,11	5,40	48,65

LRE- leishmaniose cutânea com resolução espontânea precoce

LC- leishmaniose cutânea curada após tratamento específico

Ama – amastigotas

PIG – processo inflamatório crônico granulomatoso

PIC – processo inflamatório crônico

DIF – infiltrado difuso

Considerando a identificação de *Leishmania* sp por qualquer exame, a quantidade de parasitos detectada nos dois grupos foi semelhante ( $p = 0,09$ ), apesar da tendência a maior concentração de casos positivos no grupo LC. Foi possível evidenciar parasitos em todos os casos do grupo LRE. Em 5 pacientes avaliados, a infecção foi confirmada por PCR. Em 1 caso, por isolamento em cultivo. Em 3 casos, houve visualização de amastigota no exame histopatológico. Em 3 casos, visualizou-se o parasito apenas por imunohistoquímica. Nestes casos, eram encontrados no meio extracelular e/ou no citoplasma de células infectadas presentes no infiltrado inflamatório em derme, raramente na epiderme. A quantidade de parasitos identificados por imunohistoquímica das lesões dos 12 pacientes do grupo LRE variou de 0 a  $0,28/\text{mm}^2$

(Tabela 3).

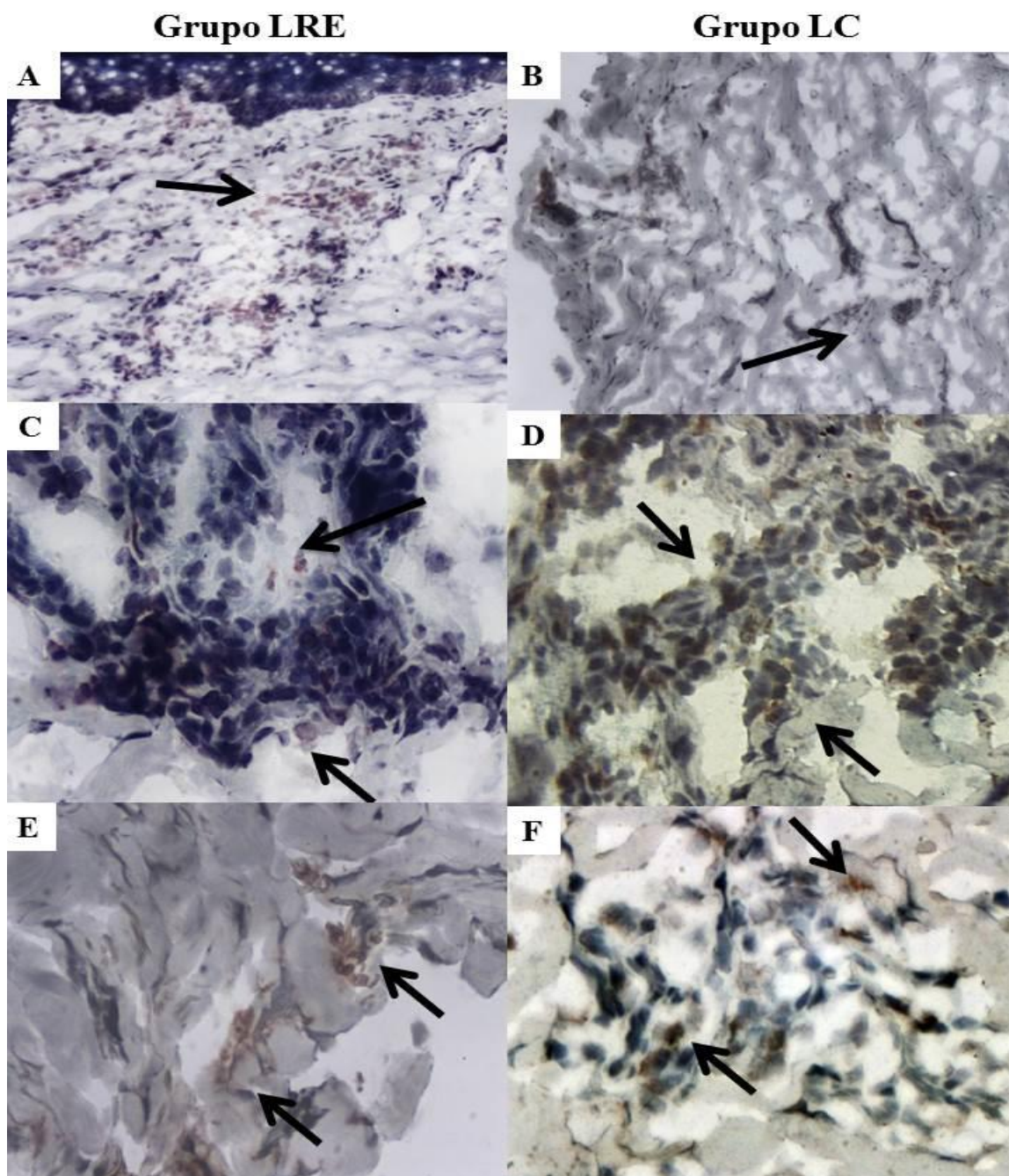
O exame microscópico dos tecidos de lesão preparados por imunohistoquímica demonstrou, em geral, infiltrado inflamatório intenso com concentração predominante ao redor dos vasos sanguíneos e predomínio de infiltrado celular com marcação para CD4 (semelhante nos dois grupos;  $p=0,704$ - Figura 4A e 4B) e CD8 (predominante no grupo LRE;  $p=0,04$ - Figura 4C, 4D e 5A) (Tabela 3). Houve maior quantidade de células B-CD22 positivas no grupo LC,  $p$ -valor= $0,001$  (Tabela 3, Figuras 4E, 4F e 5B).



**Tabela 3:** Contagem percentual e por mm<sup>2</sup> dos marcadores estudados nos sítios de lesões cutâneas do grupo de resolução espontânea (LRE) em comparação ao grupo de leishmaniose cutânea curada após tratamento específico (LC).

<b>Células ou marcadores inflamatórios</b>	<b>LRE Mediana (mínimo-máximo)</b>	<b>LC Mediana (mínimo-máximo)</b>	<b>p-valor*</b>
<b>CD4 (%)</b>	30,64 (27,62-34,31)	31,42 (20,62-41,93)	0,704
<b>CD8 (%)</b>	27,61(22,57-33,20)	23,07 (17,19-39,36)	<b>0,040</b>
<b>CD22 (%)</b>	13,45 (12,10-18,75)	19,14 (14,97-22,75)	<b>0,001</b>
<b>Neutrófilos (%)</b>	19,49 (10,79-36,19)	19,72 (6,79-53,58)	0,934
<b>NET (mm<sup>2</sup>)</b>	0,24 (0-1,03)	0,35 (0-1,62)	0,497
<b>Macrófagos (%)</b>	16,64 (9,18-28,14)	22,29 (17,10-29,49)	<b>0,001</b>
<b>CD56(%)</b>	7,33(4,31-22,38)	11,27 (6,98-16,57)	<b>0,007</b>
<b>CD69 (%)</b>	6,52 (3,36-16,73)	15,91 (10,74-25,43)	<b>0,001</b>
<b>CD25 (%)</b>	6,07 (3,41-19,96)	14,27 (7,47-16,8)	<b>0,001</b>
<b>KI67 (%)</b>	8,74 (4,93-17,15)	14,33 (8,71-21,38)	<b>0,001</b>
<b><i>Leishmania</i> (mm<sup>2</sup>)</b>	0,08 (0-0,28)	0,30 (0-1,27)	0,09
<b>IFN<math>\gamma</math> (%)</b>	24,67 (20,51-28,40)	21,38 (16,11-27,14)	<b>0,004</b>
<b>IL-10 (%)</b>	14,43 (3,10-18,36)	24,58 (12,4-34,00)	<b>0,001</b>
<b>ST2L (%)</b>	6,9 (4,00-11,89)	16,24 (11,72-37,12)	<b>0,001</b>
<b>Foxp3 (%)</b>	12,91 (7,69-20,23)	15,94 (8,57-21,84)	<b>0,018</b>
<b>Granzima B (%)</b>	9,13 (3,28-13,18)	13,37 (8,34-19,00)	<b>0,001</b>
<b>Arginase (%)</b>	14,02 (5,00-18,07)	19,56 (9,22-35,76)	<b>0,015</b>
<b>IL-17 (%)</b>	16,23 (6,33-21,39)	19,79 (10,84-25,17)	<b>0,007</b>
<b>IL-5 (%)</b>	4,97 (2,47-7,8)	7,14 (3,54-12,12)	<b>0,001</b>
<b>IL-33(%)</b>	14,91 (4,8-24,16)	21,57 (14,11-28,14)	<b>0,001</b>

\*Negrito: p-valores significativos

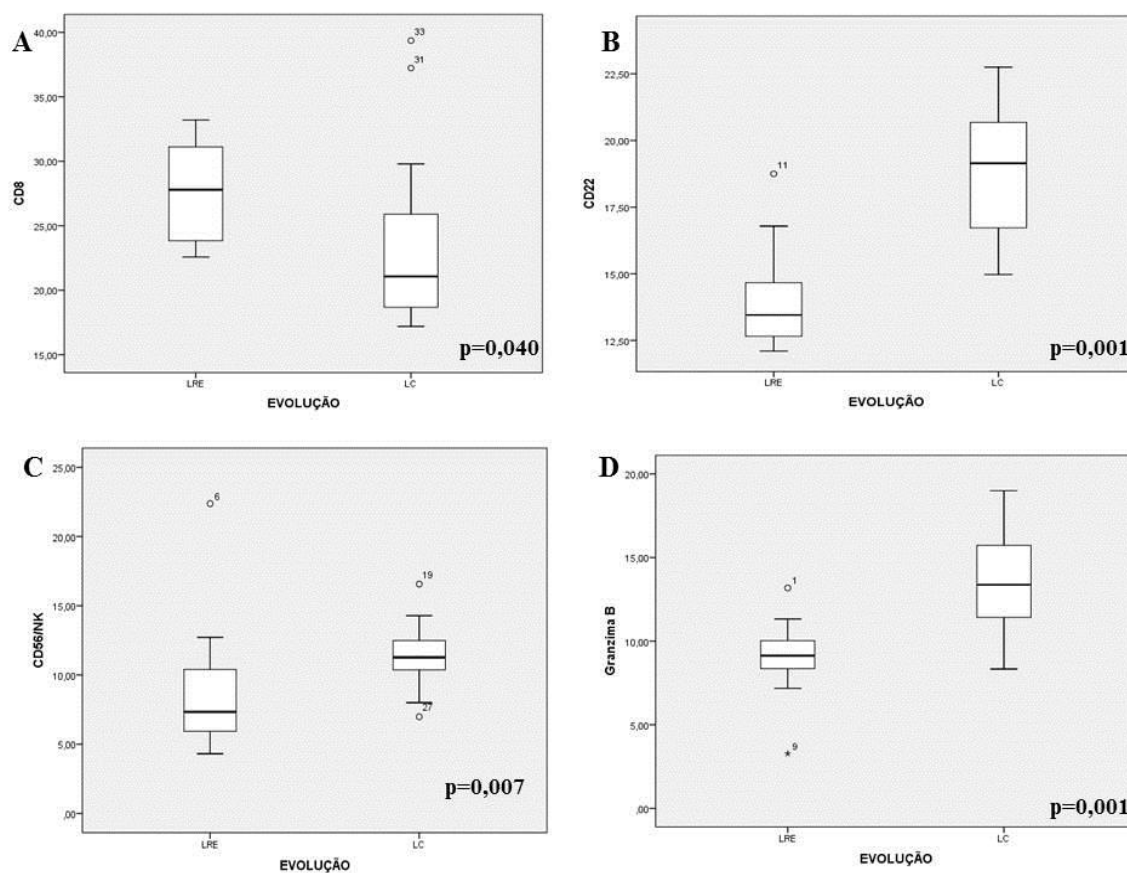


**Figura 4:** Avaliação da resposta inflamatória *in situ* por imunohistoquímica no grupo LRE e grupo LC. Marcações positivas em castanho-enegrecido. (A) e (B) células T CD4. (C) e (D) células T CD8. (E) e (F) células T CD22. Aumento 100X nas fotos A e B, e 400X nas demais. Setas indicam áreas de positividade.

De modo geral, os pacientes do grupo LC apresentaram marcadores de perfil inflamatório em níveis superiores ao do grupo LRE e, para alguns deles observou-se diferença estatisticamente significativa (Tabela 3). Destaca-se a presença dos

marcadores CD69, CD25, Ki67 e granzima B que indicam maior ativação celular no grupo LC.

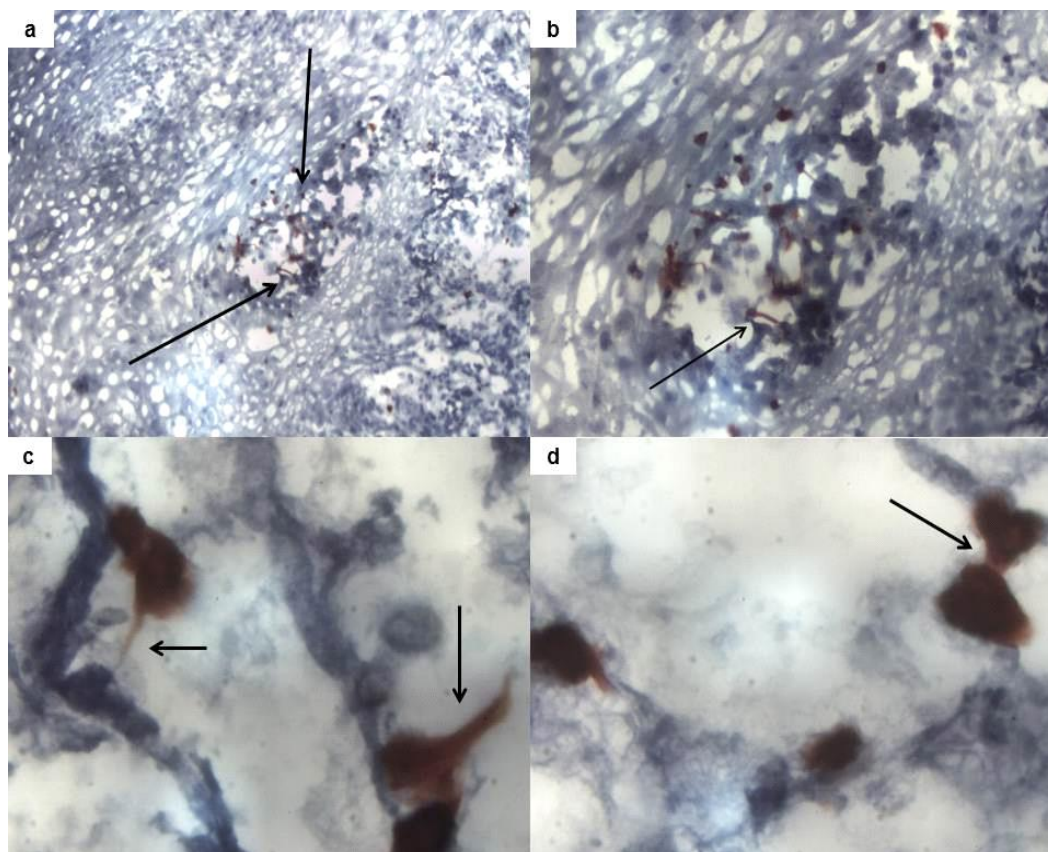
Células NK (CD56) e a enzima de grânulo citotóxico granzima B eram mais presentes em lesões LC (respectivamente  $p=0,007$  e  $0,001$ ), indicando maior atividade citotóxica no grupo LC (Tabela 3; Figuras 5C e 5D).



**Figura 5.** Contagem percentual dos marcadores estudados nas lesões cutâneas dos pacientes de resolução espontânea precoce (LRE) e de pacientes com leishmaniose cutânea curada após tratamento específico (LC). (A) CD8, (B) CD22, (C) CD56 e (D) Granzima B. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Como pode ser verificado na Tabela 3, não houve diferença entre os grupos com relação à quantidade de neutrófilos ( $p=0,93$ ) ou na formação das *neutrophil extracellular traps* (NETs) que ocorreu 50,0% dos casos LC e em 33,34% dos casos do grupo LRE, conforme exemplificado na Figura 6A-D. As NETs mostraram-se de forma

predominante, em áreas de elevadas concentrações neutrofílicas, bem como nas proximidades de vasos sanguíneos.



**Figura 6.** Avaliação da resposta inflamatória *in situ* por imunohistoquímica no grupo de leishmaniose de resolução espontânea precoce: Neutrófilos e formação de NETs. (a) Aumento 100X. (b) Aumento 200X. Aumento 1000X nas demais. Setas indicam exemplos de formação das NETs.

Macrófagos, células ao mesmo tempo hospedeiras e efetoras na leishmaniose eram mais encontradas no grupo LC ( $p=0,001$ ; Tabela 3 e Figura 7A). Quando os grupos foram comparados na sua totalidade verificou-se que a distribuição de iNOS, CD62E e TGF- $\beta$  foi semelhante entre eles, com variação de discreto a muito intenso. No entanto, após o agrupamento dos casos entre pouca resposta (ausente ou discreto) e resposta intensa (moderado, intenso ou muito intenso), verificamos diferença

estatisticamente significativa entre os grupos com tendência a maior reatividade para CD62E no grupo LRE, p-valor=0,026 (Tabela 4). Já a enzima arginase era mais concentrada no grupo LC, (p-valor=0,015; Figura 7B).

**Tabela 4.** Comparação de intensidade da expressão das enzimas óxido nítrico sintase, E-selectina e fator de crescimento tumoral beta entre os grupos analisados.

Marcadores Inflamatórios	Grupos	Pouca resposta	Resposta intensa	p-valor
iNOS	LRE	0	12	0,232
	LC	5	19	
CD62E	LRE	1	11	<b>0,026</b>
	LC	12	12	
TGF- $\beta$	LRE	5	7	0,137
	LC	11	13	

LRE- leishmaniose cutânea com resolução espontânea precoce;

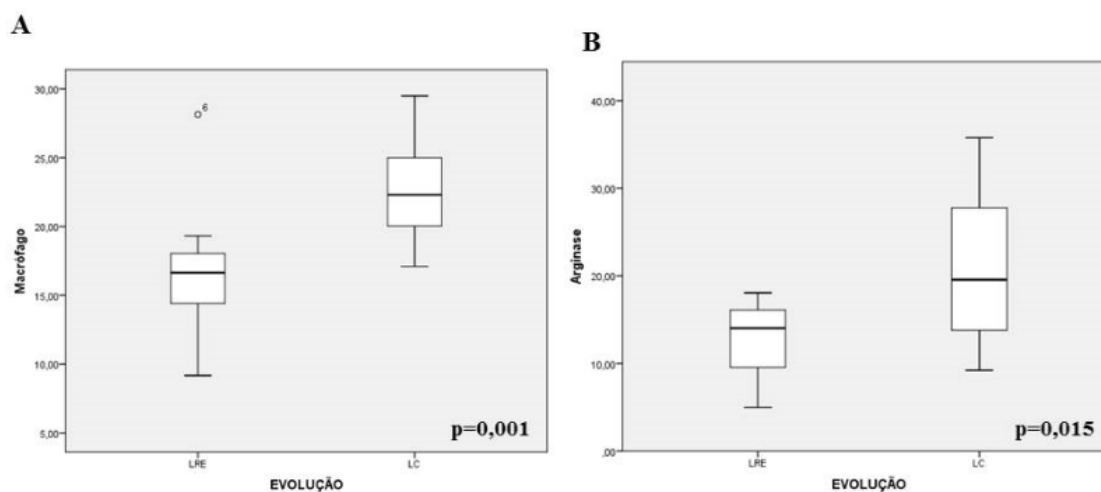
LC- leishmaniose cutânea leishmaniose cutânea curada após tratamento específico;

iNOS- óxido nítrico sintase induzida;

CD62E-E-selectina;

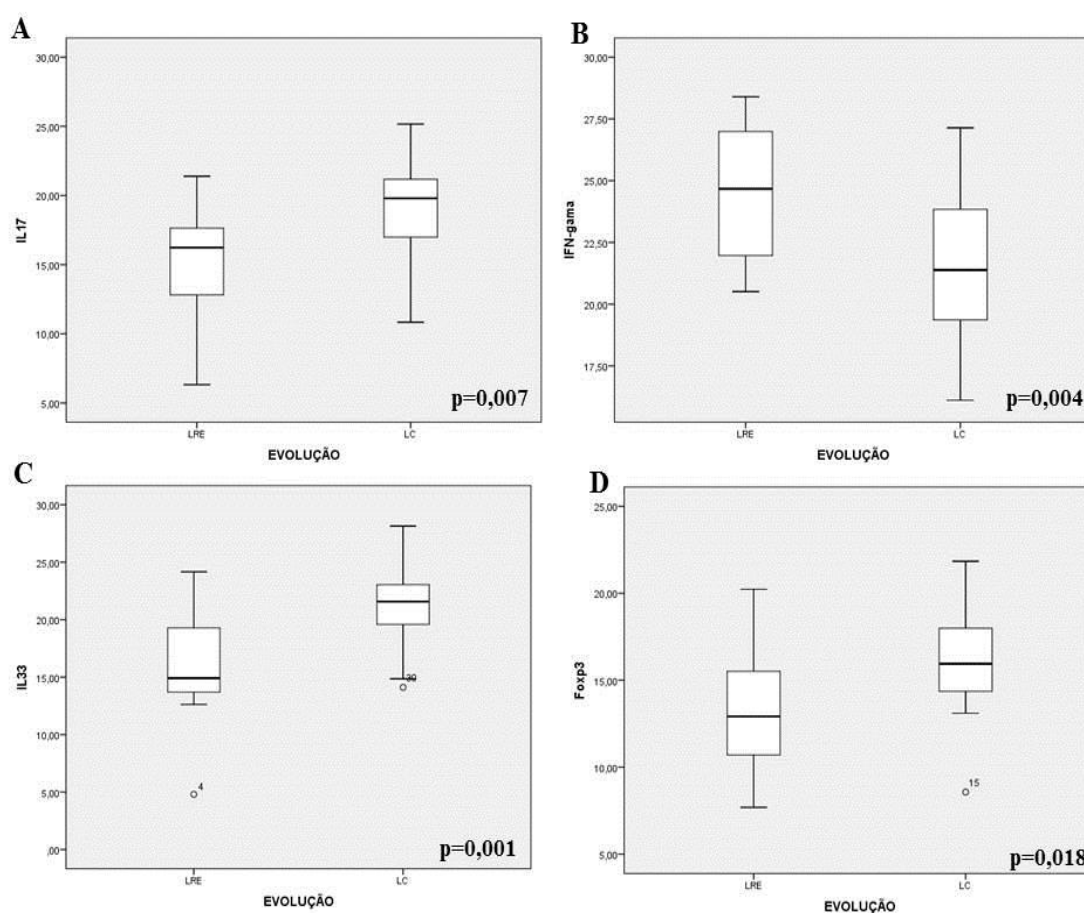
TGF- $\beta$ - fator de crescimento tumoral beta;

\***Negrito:** p-valores significativos



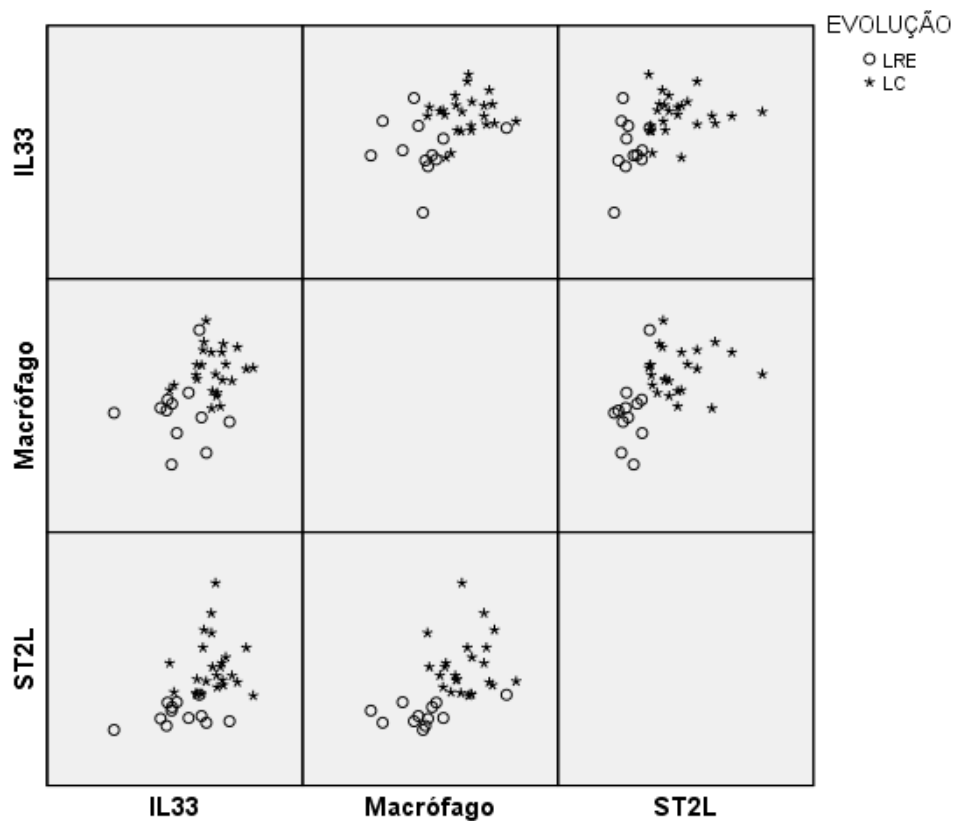
**Figura 7.** Contagem percentual dos marcadores estudados nas lesões cutâneas dos pacientes de resolução espontânea precoce (LRE) e de pacientes com leishmaniose cutânea curada após tratamento específico (LC). (A) Macrófagos e (B) Arginase. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

A identificação de maior atividade citotóxica (aumento de CD56 e granzima B) e verificação de maior concentração celular nos casos LC, foi corroborada pela maior intensidade de citocinas pró-inflamatórias como a IL-17 ( $p=0,007$ - Figura 8A- Tabela 3), mas não de IFN- $\gamma$ , mais presente no grupo LRE ( $p=0,004$ ; Tabela 3 e Figura 8B). Por outro lado, citocinas e moléculas ligadas à regulação da resposta imune eram mais concentradas no grupo LC [IL-5  $p=0,001$ ; IL-10  $p=0,001$ ; IL-33  $p=0,001$  (Figura 8C); ST2L  $p=0,001$ ; FoxP3  $p=0,018$  (Figura 8D); Tabela 3].



**Figura 8.** Contagem percentual dos marcadores estudados nas lesões cutâneas dos pacientes de resolução espontânea (LRE) e de pacientes que necessitaram de tratamento (LC). (A) IL-17, (B) Interferon-gama, (C)IL-33 e (D) FoxP3. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

A Figura 9 demonstra as correlações estatisticamente significativas, entre os grupos, pelo coeficiente de Spearman.



**Figura 9.** Matriz de dispersão dos níveis de macrófagos (MØ, ST2L e IL-33) entre os grupos de resolução espontânea (LRE) e de pacientes que necessitaram de tratamento (LC).

Coefficiente de Spearman. Valor de  $p < 0,05$  considerado significativo

MØ e IL-33 -  $p=0,023$ ;  $r=0,377$ ;

MØ e ST2L-  $p=0,001$ ;  $r=0,563$ ;

IL-33 e ST2L-  $p=0,003$ ;  $r=0,483$

## 6 DISCUSSÃO

Nesta dissertação, foi possível verificarmos as diferenças clínicas, laboratoriais e de perfil imunológico entre os pacientes com LCL na forma de resolução espontânea precoce (LRE) e aqueles com a forma típica da doença e com necessidade de terapêutica específica.

É reconhecido o fato que a LCL apresenta-se como úlcera com tendência à cura espontânea a longo prazo e que apenas um reduzido percentual dos pacientes apresenta evolução para cura de forma precoce, sem a necessidade de instituição de tratamento (Bari & Raham, 2008; Ministério da Saúde, 2010). Assim, a comparação de dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com LCL na forma de resolução espontânea precoce com formas cutâneas típicas que necessitaram de tratamento, e sua posterior correlação com o perfil da resposta imunológica *in situ* pode evidenciar características que permitam o melhor entendimento deste fenômeno. Como consequência, saber como e por que alguns pacientes conseguem controlar a infecção poderia indicar caminhos para o melhor manejo dos casos de LTA, seja pela instituição de tratamentos coadjuvantes, seja pelo desenvolvimento de imunoterápicos que estimulem o perfil de resposta imune identificado. Além disto, desenhos vacinais podem utilizar este mesmo conhecimento.

O diagnóstico de LCL nos casos de resolução espontânea avaliados no presente estudo foi confirmado por identificação do parasito por um ou mais métodos comprobatórios. Este dado permitiu a realização de um estudo comparativo com maior fidedignidade, já que apenas casos com confirmação parasitológica foram incluídos no



grupo LRE. Em virtude dos inúmeros diagnósticos diferenciais da LTA, a comprovação diagnóstica através de exames que envolvam a visualização do parasito ou de seu DNA é importante para o correto manejo clínico destes pacientes (Gontijo, 2003; de Lima Barros et al, 2005).

Na primeira etapa do estudo, avaliamos de forma comparativa 13 pacientes com a apresentação clínica do tipo resolução espontânea precoce e 432 com lesões cutâneas típicas de LCL. Não houve diferença entre os grupos com relação ao sexo ou faixa etária. Houve predomínio de homens com mediana de idade de 37 anos e lesão única, fato que está em concordância com os dados do Ministério da Saúde do Brasil, que relata 74% de casos de leishmaniose tegumentar em homens com idade superior a 10 anos (Ministério da Saúde, 2010).

Na avaliação clínica dos casos, observou-se que os pacientes com LRE, demonstraram maior percentual de lesão única, com aspecto cicatricial e localizadas em tronco posterior. Além disso, destaca-se que um grande número de pacientes LRE apresentou identificação de parasitos do gênero *Leishmania* apenas na PCR. É de conhecimento amplo que o PCR é um exame laboratorial com elevada sensibilidade, que permite a confirmação diagnóstica em casos atípicos ou de difícil diagnóstico (Rodrigues et al, 1994; Fagundes et al, 2007). Este dado indiretamente pode indicar menor carga parasitária, já que o grupo LC apresentou percentual expressivo de positividade no isolamento em cultivo ou a presença de dois ou mais exames parasitológicos positivos. O controle da carga parasitária é condição essencial para a diminuição do processo inflamatório por diminuição de antígeno disponível para os processos de reconhecimento e ativação celular. Consequentemente, ocorre a instalação do reparo tecidual iniciando o processo de cicatrização das lesões. Como a resposta imune já foi identificada como responsável pela destruição tecidual e surgimento das

úlceras cutâneas (Belkaid et al, 2002), a diminuição do estímulo antigênico é fundamental para a diminuição da atividade inflamatória. Corroborando esta hipótese, verificou-se que o tempo mediano de cicatrização de lesão foi inferior nos pacientes com resolução espontânea, quando comparado aos da forma típica.

No grupo de pacientes com necessidade de tratamento (LC), houve predomínio de lesões francamente ulceradas, apresentando forte reação na IDR, além do maior encontro de amastigota no exame histopatológico e da positividade na cultura. Observou-se também maior positividade nos exames comprobatórios da doença (cultura, achado de amastigotas no exame histopatológico, *imprint* e PCR), quando agrupados. No grupo LC houve maior positividade em 3 ou mais exames parasitológicos, enquanto que todos os casos de LRE foram positivos em apenas 1 exame. No grupo LC, o tempo mediano de cicatrização das lesões nos membros inferiores foi superior ao de lesões em outros locais. As demais características clínicas, e o seguimento pós-tratamento foram semelhantes para os dois grupos estudados.

Ao serem avaliados os pacientes do grupo LRE, verificou-se nos exames laboratoriais 66,7% com sorologia positiva pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), embora seus títulos não fossem muito elevados, o que corrobora os dados da literatura sobre a LCL (Anthony Christensen & Johnson, 1980; Guimarães et al, 1983); a maior parte deles apresentou positividade pelo ELISA. Na histopatologia, a visualização de amastigotas deu-se em reduzido percentual de pacientes. A positividade na cultura para promastigotas do gênero *Leishmania* em meio NNN (McNeal, Novy & Nicole) também ocorreu em um número mínimo de pacientes.

Na literatura, os índices de sensibilidade dos exames histopatológicos e de isolamento em meio de cultivo tem demonstrado ampla variação (Furtado, 1980;

Romero et al, 2001; Amato, Andrade & Duarte, 2003), todavia a presença de maior carga parasitária facilitaria sua detecção.

A necessidade de tratamento específico e a resposta à terapia antimonial têm sido foco de ampla discussão. Estudos realizados na América Latina mostram diferenças marcantes nas taxas de cura com antimoniais pentavalentes, bem como no desenvolvimento de resistência à terapêutica (Arana et al 1994; Deps et al, 2000; Armijos et al, 2004; Andersen et al, 2005; Oliveira-Neto et al, 2006; Llanos- Cuentas, 2008). Além disto, descreveu-se anteriormente que a instituição de terapêutica específica precoce na LTA não impede o desenvolvimento da lesão cutânea (Machado, 2002; Unger, 2009) e está mais associada à falha terapêutica (Unger, 2009; Antonio et al, 2014), confirmando a relevância da resposta inflamatória e imune local na patogênese da doença. Neste contexto, recentemente verificou-se que as lesões com tempo de evolução curto e com baixa reatividade para IDRM, estariam associadas a casos de falha terapêutica (Antonio et al, 2014), mais uma vez indiretamente sugerindo que a instalação da resposta imune é capaz de facilitar o surgimento de úlceras. Todavia sua atividade é fundamental para o controle da carga parasitárias e para a consequente cura das lesões. Nossos resultados de caracterização da resposta inflamatória *in situ* também apontam para esta hipótese, já que nos casos LC verificaram-se indicadores de maior atividade citotóxica como células NK e a enzima granular granzima B, aliada à presença de marcadores de regulação da lesão. O equilíbrio da resposta imune com predominância de tipo 1 tem sido apontada como fundamental para o controle da carga parasitária e para a instalação dos fenômenos de reparação tecidual (Belkaid, 2000; Gomes-Silva, 2007; Morgado et al, 2010; Ministério da Saúde, 2010).

Diversos fatores são capazes de influenciar a resposta terapêutica ao antimoniato de meglumina. Dentre eles podemos citar a espécie ou cepa de *Leishmania* infectante, a

presença de comorbidades clínicas, número de lesões igual ou superior a três, o peso corporal acima de sessenta e oito quilos e a irregularidade de tratamento (Berman et al, 1982; Allen, 1989; Arevalo, 2001; rochu et al, 2003; Croft, 2003; Croft, 2006; Rodrigues, 2006). No entanto, o uso de medicamentos de segunda escolha não tem demonstrado maior eficácia e/ou menor taxa de efeitos adversos. Desta forma, novos rumos para o tratamento da LTA devem ser discutidos. Neste contexto, pode-se questionar a necessidade de propor tratamento específico em casos com evidência de progressão para a resolução espontânea precoce. Muitos autores indicam o tratamento mesmo em casos de evidente regressão espontânea das lesões, pela potencial capacidade de surgimento de lesões metastáticas secundárias, notadamente em mucosas nos casos de infecção por *L. (V.) braziliensis* (Marsden, 1984; Schubach, 1990). No entanto, a experiência do LAPCLIN VIGILEISH e o acompanhamento sistemático dos casos não tem confirmado esta possibilidade.

Os critérios de cura, essencialmente clínicos, variam conforme os autores, o que poderia influenciar as grandes diferenças encontradas na literatura nos índices de sucesso da terapia com antimoniato de meglumina. Quando há evidência de cicatrização progressiva, sugere-se o prolongamento da observação por até seis meses (Ministério da Saúde, 2010). Ressalta-se também achados de literatura, que comprovam a persistência de parasitos e/ou DNA específico para *Leishmania* em cicatrizes, sugerindo-se que a cura clínica da LTA não está necessariamente associada à cura estéril (Schubach et al, 1998; Mendonça et al, 2004, Morgado et al 2010). Desta forma, a avaliação clínica de melhora progressiva de lesão cutânea seria um sinal fidedigno de bom prognóstico da doença.

Conforme destacado anteriormente, o grande receio da não instituição de terapêutica nos casos diagnosticados como LTA é o surgimento de lesões mucosas. A

LM ocorre em pequena proporção (3 a 5%) de casos no Brasil, podendo surgir vários anos após a cicatrização da lesão primária ou mesmo como apresentação inicial da doença (Lainson, 1983; Ministério da Saúde, 2010). É amplamente difundido na literatura que a LM ocorre como consequência a metástases por via hemática (Llanos-Cuentas et al. 1985). No entanto, em parte destes casos, não há história anterior de lesão cutânea leishmaniótica, sendo então a apresentação considerada de origem indeterminada (Marsden, 1984). Classicamente, o fenômeno da resolução espontânea e a realização de tratamentos irregulares foram considerados fatores de risco para o surgimento das formas mucosas (Marsden, 1984; Schubach, 1990). Outros fatores ainda desconhecidos parecem influenciar o aparecimento da LM, e estudos são necessários para melhor compreensão desta apresentação que possui curso clínico e prognóstico distinto das formas clássicas cutâneas (Marsden, 1986). É importante ressaltar que, os casos de LRE aqui avaliados não receberam nenhuma forma de tratamento específico por via sistêmica e/ou local, e o acompanhamento anual por até 5 anos não evidenciou sinal de recidiva das lesões cutâneas ou o surgimento de lesões mucosas, mesmo que incipientes.

Alguns autores demonstraram que lesões de LTA localizadas nos membros inferiores apresentavam um tempo superior para a cura (Oliveira-Neto, 1996; Schubach, 2005; Azeredo-Coutinho, 2007), todavia houve maior proporção de lesões curadas nesta localização (Romero, 2001; Ampuero, 2009). No presente estudo, demonstrou-se que as lesões nos membros inferiores, nos pacientes tratados, apresentavam tempo de cicatrização superior aos de lesões em outras localizações, dado que corrobora os achados dos autores citados; a localização em membro inferior não pareceu influenciar o tempo de cicatrização nos pacientes com LRE.

Pôde-se comprovar que o tempo mediano de cicatrização das lesões cutâneas na LRE foi inferior aos dos demais casos de LCL. Poder-se-ia inferir uma provável capacidade de controle mais eficiente no estabelecimento do processo inflamatório e na sua progressão. Por outro lado, os achados nos pacientes submetidos ao tratamento sugerem que a maior carga parasitária exerce pressão sobre a resposta inflamatória, levando à manutenção de estímulo ao processo inflamatório com persistência de atividade de lesões, o que retardaria o controle da inflamação e cicatrização tecidual.

A fim de melhor caracterizar a resposta imunológica destes pacientes, na segunda etapa do estudo, foi comparada a quantidade e qualidade do infiltrado inflamatório presente nos casos LRE e naqueles com LC. É notório que quanto mais equilibrada a resposta do tipo 1, maior a eficiência na eliminação do parasito, enquanto que maior intensidade da resposta de tipo 2, acarreta piora no curso da infecção. Com base no exposto, podemos concluir que, para a cura do paciente, seja de forma espontânea, seja após tratamento específico, é necessário que a infecção tenha estimulado o sistema imune a estabelecer uma resposta celular de tipo 1 equilibrada (Ministério da Saúde, 2010). O balanço entre as respostas de tipo 1 e tipo 2 tem sido apontado como determinante na evolução da LTA para formas autolimitadas ou graves (Awasthi et al, 2004; Gollob et al, 2008).

O estudo *in situ* permitiu verificar a composição, extensão e organização do processo inflamatório nos dois grupos de estudo. A comparação dos dados de localização das lesões, sexo e idade entre os grupos, não demonstrou diferenças significativas entre eles. Esta distribuição indicou a eficiência do pareamento que permitiu as comparações da composição e organização do processo inflamatório.

Os grupos se assemelhavam nas concentrações de células T CD4<sup>+</sup>, neutrófilos, formação de NET e parasitos detectáveis por imunohistoquímica, apesar da nítida

tendência a maior carga parasitária no grupo LC. As NETs foram descritas como um importante mecanismo de morte celular envolvidos na eliminação de diversos tipos de agentes infecciosos (Brinkmann & Zychlinsky, 2007). Neste estudo, verificou-se sua presença em ambos os grupos e, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas entre eles uma melhor caracterização de sua arquitetura e distribuição poderia se tornar objeto interessante de estudo.

Nos pacientes com necessidade de tratamento (LC) houve maior percentual de linfócitos CD22, macrófagos, células *natural killers*, de marcadores inflamatórios relacionados à ativação e proliferação celular (CD69, CD25, Ki67, IL-17) e de citocinas/moléculas ligadas ao fenômeno de regulação (IL-10, IL-5, IL-33, ST2L e FoxP3). Já nos pacientes com resolução espontânea, houve maior percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, de expressão de CD62E e IFN- $\gamma$ .

A importância da resposta inflamatória na formação e manutenção das lesões já foi demonstrada no modelo murino com inoculação de baixa carga parasitária mimetizando a infecção natural (Belkaid, 2000). Na fase inicial da infecção que cursa com o pico de carga parasitária na derme, houve ausência de formação de lesão ou de quaisquer alterações histopatológicas locais. A partir do estabelecimento do infiltrado inflamatório agudo de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos houve morte dos parasitos no local e o surgimento da lesão tegumentar (Belkaid, 2000). No presente estudo, o grupo de pacientes que necessitou de tratamento específico apresentou perfil de ativação e proliferação celulares mais intensos o que sugere manutenção do estímulo inflamatório provavelmente por maior oferta de antígeno parasitário, já que, apesar de não se ter detectado diferença na carga parasitária visualizada por imunohistoquímica no grupo de estudo da etapa 2, os dados de exames laboratoriais apontaram para maior facilidade de isolamento e evidência dos parasitos, nos casos que necessitaram de

tratamento específico. Neste contexto, é ainda possível lembrar que o parasito não é homogeneamente distribuído nos tecidos das lesões. Como a biopsia é um procedimento pontual e os cortes de tecido para análise por imunohistoquímica ou histopatologia convencional avaliam apenas uma pequena parcela deste material, parasitos presentes não necessariamente são identificados no exame de imunohistoquímica ou no histopatológico convencional, principalmente quando em pequena quantidade. Neste ponto, a PCR é considerada mais sensível por sua capacidade de identificar quantidades mínimas de DNA parasitário e pela necessidade de homogeneização da amostra de tecido a ser examinado (Bari & Rahman, 2006). Assim, em conjunto os resultados obtidos sugerem menor carga parasitária nos casos de LRE levando a maior equilíbrio da resposta imune específica com consequente facilitação de ativação do fenômeno de reparo tissular.

Notou-se que os pacientes com resolução espontânea demonstraram níveis superiores de  $\text{IFN}\gamma$  e de linfócitos T  $\text{CD8}^+$ , a despeito da menor concentração de macrófagos. No entanto, a enzima granular granzima B estava aumentada nos casos LC em consonância com o aumento de células NK, podendo-se sugerir que nos casos de LRE a população T  $\text{CD8}^+$  exerceria papel predominantemente secretório, com menor intensidade de efeito citotóxico. A literatura demonstra a grande capacidade de produção de  $\text{IFN}\gamma$  por células T  $\text{CD8}^+$  (Abbas & Lichtman, 2008). Machado et al (2002) avaliaram a citotoxicidade *in situ* na LTA típica antes do tratamento, evidenciando uma notável presença de células T  $\text{CD8}^+$  e células ativadas, sugerindo seu envolvimento na eliminação do parasito e desenvolvimento da úlcera. Outros autores sugerem ainda que o aumento dos níveis de células T  $\text{CD8}^+$  e a produção de  $\text{IFN}\gamma$  poderiam ser importantes para a cura das lesões e também para proteção imunológica (Da-Cruz et al, 1994; Gomes-Silva et al, 2007). Gomes-Silva et al (2007) verificaram que, apesar de não



haver diferença significativa entre a quantidade da citocina do tipo 1-  $\text{IFN}\gamma$  - no sangue periférico de pacientes LC em relação a casos de cura espontânea, neste último havia uma tendência a maiores valores indicando que o aumento de  $\text{IFN}\gamma$  na LRE é consistente e mantido, pois ocorre repercussão na resposta imune periférica. Na forma cutânea típica da LTA, as lesões são caracterizadas pela intensa atividade de macrófagos ativados aos estágios parasitocidas através da predominância da resposta imune celular Th1, sendo o  $\text{IFN}\gamma$  importante citocina responsável neste processo (Morgado et al, 2008). Esta resposta tem como resultado a ativação de macrófagos, tornando-os capazes de eliminar o parasito, controlando a infecção. Por conseguinte, poderíamos cogitar a possibilidade de que mesmo com um menor número de macrófagos presentes na LRE, a ativação dessas células seria mais eficiente contribuindo para o controle da doença. Não se pode esquecer que os macrófagos são ao mesmo tempo as células responsáveis por grande parte da eliminação da carga parasitária e células hospedeiras para a proliferação do mesmo parasito, de acordo com seu grau de ativação. Assim, um menor número de macrófagos mais ativados pode ser mais eficiente que uma grande quantidade de macrófagos com parte deles sendo permissiva ao parasitismo e multiplicação parasitária.

Notou-se uma menor carga parasitária nos pacientes com LRE. Dentro desta perspectiva, a diminuição do número de parasitos, leva a uma redução do estímulo da resposta imune pelo menor aporte de antígenos. Desta forma, a cicatrização se inicia através do controle do processo inflamatório (morte de células efetoras não estimuladas), aumento da função de fibroblastos, com produção de fibrose e tecido de cicatrização (Ministério da Saúde, 2010).

Souza et al (2013) demonstraram que na LTA, durante a doença ativa, há a predominância de citocinas pró-inflamatórias como  $\text{IFN}\gamma$ , IL-17 e  $\text{TNF-}\alpha$ , indicando

uma fase pró-inflamatória da resposta imune. Além disso, os autores demonstraram aumento discreto dos níveis de TNF- $\alpha$  em pacientes, no período pós-tratamento e nos casos de cura espontânea era possível observar iNOS e IL17, mesmo que em níveis mais baixos que aqueles encontrados nas lesões ativas. No nosso estudo, a IL-17 também era predominante nos casos de LC, todavia a iNOS possuía distribuição heterogênea, não sendo possível identificar diferença entre os grupos. Como nos casos de LC o número de macrófagos era estatisticamente mais elevado, corrobora-se a sugestão de que nestes pacientes muitos destes elementos celulares não tinham ativação ao estado parasiticida e poderiam estar funcionando como células hospedeiras, aumentando assim a presença de parasitos e de seus antígenos nas lesões, com consequente estímulo mantido à resposta inflamatória.

Pereira-Carvalho et al (2013), demonstraram que as células CD69<sup>+</sup> foram negativamente correlacionadas com os níveis da citocina regulatória IL-10. Como a presença de CD69 indica estados de ativação celular, este resultado indicaria um desvio para a atividade inflamatória. Nossos resultados também demonstraram maior percentual de células expressando a molécula CD69 nos casos de LC, corroborando nossa sugestão de atividade proinflamatória predominante nos casos de LTA que necessitaram de tratamento específico para atingir a cura clínica das lesões.

Em conjunto, nossos resultados de avaliação da resposta inflamatória *in situ* demonstram que as lesões com resolução espontânea apresentam um perfil de menor intensidade inflamatória. Além disto, corroborando os dados de maior equilíbrio na resposta tecidual, clinicamente estes pacientes apresentam evolução mais benigna acompanhada por menor carga parasitária aparente. Há diversos mecanismos envolvidos na progressão da doença que necessitam de melhor compreensão; dentre eles, destaca-se o controle do processo inflamatório e o estabelecimento do equilíbrio parasito-

hospedeiro. O balanço entre resposta Th1/Th2, com resposta do tipo 1 cursando com resistência e cura, enquanto que a resposta predominantemente do tipo 2 levaria à suscetibilidade e doença progressiva é uma questão central nesta discussão (Pereira-Carvalho et al, 2013). Todavia, o desequilíbrio da resposta para mais ou para menos poderia trazer como consequência maior gravidade das lesões. Os resultados aqui apresentados, reforçam os de outros autores (Morgado et al, 2008, Morgado et al, 2010, Marreti-Mitra et al, 2011, Palmeiro et al, 2012, Pereira-Carvalho et al, 2013), ao sugerirem que o controle da resposta imunológica é multifatorial, o que dificultaria a compreensão da evolução das lesões de LTA para a cura ou cronicidade/agravamento.

As diferenças encontradas entre as formas com resolução espontânea precoce e aquelas que necessitam de tratamento específico sugerem que a formação das lesões não depende somente da presença do parasito e que outros mecanismos estão envolvidos na formação dessa apresentação clínica. Mais estudos deverão ser realizados a fim de uma melhor caracterização clínica e de imunorregulação entre estas formas clínicas. A avaliação de outros marcadores torna-se necessária para que se esclareça mais profundamente o papel da resposta imunológica na resolução espontânea na LCL.

## 7 CONCLUSÕES

1- A verificação de que, em comparação com o grupo de pacientes tratados, os pacientes do grupo LRE apresentavam maior percentual de lesão única, com menor número de úlceras francas e maior presença de processo cicatricial sugere que o processo inflamatório e/ou a carga parasitária é melhor controlada nestes casos, refletindo o melhor curso da infecção e, conseqüentemente, a cura das lesões;

2- Estes dados são corroborados pelo achado de maior positividade para a presença de parasitos por histopatologia e cultivo nos casos em que o tratamento foi necessário, enquanto que casos de LRE apresentavam maior dificuldade de evidencição do parasito, a maior parte deles com confirmação diagnóstica feita apenas pela PCR;

3- Destaca-se o fato de que, mesmo com maior quantidade de macrófagos nas lesões de LC, a ativação dos mesmos, indiretamente avaliada pela expressão de iNOS era semelhante nos dois grupos, sugerindo que, pelo menos parte desta população de macrófagos não está ativada ao estagio parasitocida, o que pode proporcionar o aumento de células hospedeiras para a multiplicação parasitária, mantendo assim carga parasitária mais elevada nos pacientes LC;

4- Em conjunto estes dados sugerem que a carga parasitária pode exercer pressão sobre a resposta inflamatória e este fato poderia ser importante na manutenção do estímulo ao processo inflamatório com persistência da atividade de lesões, dificultando o controle da

inflamação e cicatrização tecidual. Como consequência da provável capacidade de controlar o processo inflamatório, os casos de LRE apresentaram um tempo mediano de cicatrização inferior (35 dias), quando comparados aos casos LC (77 dias).

5- O estudo *in situ* permitiu verificar a composição, extensão e organização do processo inflamatório nos dois grupos de estudo. Nos pacientes com necessidade de tratamento houve maior percentual de linfócitos B CD22<sup>+</sup>, macrófagos, células NK, de marcadores inflamatórios relacionados à ativação/ proliferação celular e de citocinas de regulação. Já nos pacientes com resolução espontânea, houve maior percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, CD62E e de IFN- $\gamma$ ;

6- A dicotomia entre o percentual de expressão de granzima B, enzima ligada à citotoxicidade mediada por grânulos, e a concentração de células T CD8<sup>+</sup> nos casos LRE, aliada ao aumento da expressão de IFN $\gamma$  sugerem que as células T CD8<sup>+</sup> presentes nas lesões com cura espontânea estejam exercendo muito mais um papel secretório que citotóxico. Este achado corrobora a hipótese de que os fenômenos de lesão tecidual pela resposta inflamatória estejam menos evidentes nos casos de LRE, permitindo assim um maior equilíbrio entre parasito e resposta imune do hospedeiro que levará a maior facilidade de instalação dos fenômenos de reparação tecidual; quando isto não acontece, a cura clínica só é obtida com a instituição do tratamento específico que auxilia o controle da carga parasitária;

7- Os pacientes que apresentam resolução espontânea em LTA representam um desafio na prática clínica. Um acompanhamento clínico/otorrinolaringológico periódico, bem como orientação clara sobre os sinais e sintomas de lesões mucosas são aconselháveis para verificar a possível recorrência, mesmo que seja improvável. Mais estudos deverão

ser realizados para melhor compreensão do fenômeno de resolução espontânea e de suas implicações em médio e longo prazo.

## 8 DESDOBRAMENTOS

Os achados encontrados em nosso estudo sugerem diferenças significativas entre os pacientes com formas típicas de LC e os casos de LRE. Espera-se que este conhecimento auxilie no estabelecimento de parâmetros clínicos, laboratoriais e imunológicos que possam facilitar o diagnóstico e manuseio clínico dos pacientes, colaborando para um melhor conhecimento do comportamento da enfermidade.

O aumento da casuística, bem como a comparação destes pacientes com indivíduos em outros centros de referência poderia corroborar estes achados.

Novos estudos visando a caracterização de outros marcadores de regulação e ativação celulares, as NETs, e a quantificação de parasitos por PCR são desejáveis.

Em virtude da toxicidade potencial dos medicamentos usados, este estudo, ao contribuir para o melhor entendimento da resolução espontânea precoce, poderia evidenciar dados que corroborassem a indicação da não exposição de pacientes a um tratamento potencialmente nocivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. Editora Revinter, 6ª edição, 2008.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001; 357:593–615.

Allen, S, Neal RA. Neal. The “in vitro” susceptibility of macrophages infected with amastigotes of *Leishmania* spp. to pentavalent antimonial drugs and other compounds with special relevance to cutaneous isolates. In D. T. Hart (ed.), *Leishmaniasis*. 1989; 171: 711–720.

Amato VS, de Andrade HF, Duarte M. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop.* 2003; 85:39–49.

Ampuero J, 2009. Efficacy and safety of low-dose pentavalent antimonial for treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Bahia, Brazil: a randomized clinical trial. Thesis, Núcleo de Medicina Tropical. Brasília - DF: Universidade de Brasília, 260.

Andersen EMC-SM, Llanos-Cuentos A, Luz-Cjuno M, Echevarria J, Miranda-Verastegui C, Colina O, Berman JD. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for perureian cutaneous leishmaniasis. *J Trop Med Hyg.* 2005; 72: 133–137.

Antezana G, Zeballos R, Mendoza C, Lyevre P, Valda L, Cardenas F, Noriega I, Ugarte H, Dedet JP. Electrocardiographic alterations during treatment of mucocutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate and allopurinol. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992; 86: 31-33.

Anthony RL, Christensen HA, Johnson C. Micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1980; 29:190-194.

Antonio L de F, Fagundes A, Oliveira RV, Pinto PG, Bedoya-Pacheco SJ, Vasconcellos E de C, Valet-Rosalino MC, Lyra MR, Passos SR, Pimentel MI, Schubach A de O. Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014; 56:375-380.

Arana, B.A., Navin, T.R., Arana, F.E., Berman, J.D., Rosenkaimer, F. Efficacy of a short course (10 days) of high-dose meglumine antimonate with or without interferon-gamma in treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Clin.Infect. Dis.* 1994; 18:381–384.

Arevalo, I., B. Ward, R. Miller, T. C. Meng, E. Najar, E. Alvarez, G. Matlashewski, and A. Llanos-Cuentas. Successful treatment of drug resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clin.Infect. Dis.* 2001; 33:1847–



1851.

Armijos, R.X., Weigel, M.M., Calvopiña, M., Mancheno, M., Rodriguez, R. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 2004; 91: 153–160.

Awasthi A, Mathur, RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res.* 2004; 119: 238-258.

Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF ea. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007; 101:735-737.

Azeredo-Coutinho RB, Mendonça SC, Callahan H, Portal AC, Max G. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *J Parasitol.* 2007; 93:688-693.

Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2009;200:75-78.

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: Evaluation by two molecular markers. *Experimental Parasitology.* 2009; 42:317-322.

Bari A, Rahman S. Correlation of clinical, histopathological, and microbiological findings in 60 cases of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2006; 72: 28-32.

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

Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J. Immunol.* 2000; 165:969–977.

Belkaid Y, Stebut EV, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, et al. “CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*”. *J Immunol.* 2002; 168:3992-4000.

Berman, JD, Chulay JD, Hendricks LD, Oster CN. Susceptibility of clinically sensitive and resistant *Leishmania* to pentavalent antimony *in vitro*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1982; 31:459–465.

Brinkmann V. Zychlinsky, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs.

Nat Rev Microbiol. 2007; 5:577-582.

Brochu, C, Wang J, Roy G, Messier N, Wang XY, Saravia NG, Ouellette M. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47:3073–3079.

Brummitt CF, Porter JA, Herwaldt BL. Reversible peripheral neuropathy associated with sodium stibogluconate therapy for American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 1996; 22:878-879.

Convit J, Ulrich M, Fernandez CT, Tapia FJ, Cáceres-Ditmar G, Cásteres M, et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1993; 87: 444-448.

Costa JML, Vale KC, França F, Saldanha ACR, Silva JO da, Lago EL, et al. Cura espontânea da leishmaniose causada por *Leishmania Viannia braziliensis* em lesões cutâneas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1990;23:205-208.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology.* 2008; 180: 5771–5777.

Croft, SL, Coombs GH. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 2003; 19:502–508.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews.* 2006; 19: 111–126.

Cuba-Cuba CA, Marsden PD, Barretto AC, Jones TC, Richards F. The use of different concentrations of leishmanial antigen in skin testing to evaluate delayed hypersensitivity in American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1985; 18:231-236.

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

De Lima Barros MB, Schubach A, Francesconi-do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TM, Conceição-Silva F, et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Acta Trop.* 2005; 93: 41-47.

De Magalhães AV, Chiarini LH, Raick AN. The histopathology of cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1982; 24: 268-276.

De Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, CubaCC, et al. Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania brasiliensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1986; 28: 253-262.

Deps, P.D., Viana, M.C., Falqueto, A., Dietze, R. Avaliação comparativa da eficácia e toxicidade do antimoniato de N-metil-glucamina e do estibogluconato de Sódio BP88 no tratamento da leishmaniose cutânea localizada. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*

2000; 33:535–543.

Fagundes A. A reação intradérmica de Montenegro na clínica e na epidemiologia da leishmaniose tegumentar. Tese. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2007.

Fagundes A, Marzochi MCA, Fernandes O, Perez MA, Schubach AO, Schubach TMP, Amendoeira MRR, Mouta-Confort E, Marzochi KBF. First encounter of subclinical human *Leishmania* (*Viannia*) infection in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102: 1003-1005.

Fagundes A, Marzochi MCA, Perez M, Schubach A, Ferreira A, Silva J, et al. Skin reactivity to thimerosal and phenol-preserved Montenegro antigen in Brazil. Acta Tropica. 2007; 101:25-30.

Farah FS, Klaus SN, Frankenburg S. Protozoan and helminth infections. Dermatology in General Medicine. 1993; 2: 2772-2777.

Furtado T. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. An Bras Dermatol. 1980;55:81-86.

Furtado T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado-Pinto J(ed), Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, p.319-328,1994.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am J Pathol. 1991; 138: 867-873.

Gollob KJ, Antonelli LRV, Faria DR, Keesen TSL, Dutra WO. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. Int Immunopharmacol. 2008; 8: 1338–1343.

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. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection? Clin Exp Immunol. 2007; 149: 440-4.

Gontijo B. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2003; 36:71-80.

Goodwin LG. Pentostan (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995; 89: 339-341.

Grevelink SA, Lerner E. Leishmaniasis. Journal of the American Academy of Dermatology. 1996; 34:257-272.

Guerra JAO, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM. Aspectos clínicos e

diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36: 587-590.

Guimarães MC, Celeste BJ, Camargo ME, Diniz JM. Seroepidemiology of cutaneous leishmaniasis from Ribeira do Iguape Valley. IgM and IgG antibodies detected by means of an immunoenzymatic assay (ELISA). *Rev Inst Med Trop.* 1983; 25: 108-112.

Halim MA, Alfurayh O, Kalin ME, Dammas S, al-Eisa A, Damanhour G. Successful treatment of visceral leishmaniasis with allopurinol plus ketoconazole in a renal transplant recipient after the occurrence of pancreatitis due to stibogluconate. *Clin Infect Dis.* 1993; 16: 397-399.

Hepburn N, Tidman M, Hunter J. Aminosidine (paromomycin) versus sodium stibogluconate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994; 88: 700-703.

Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostan) and review of pertinent clinical studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 46: 296-306.

Hori S, Nomura T & Sakagushi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 299: 1057-1061.

Huang F, Chen YG. Regulation of TGF- $\beta$  receptor activity. *Cell & Bioscience.* 2012; 9: 1-10.

José FF, Silva IM, Araújo MI, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho E. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001; 34: 537-542.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 485-517.

Lima MVN, Oliveira RZ, Lima AP, Cerino DA, Silveira TGV. Leishmaniose cutânea com desfecho fatal durante tratamento com antimônio pentavalente. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2007; 82: 269 - 271.

Lord SJ, Rajotte RV, Korbitt GS, Bleackley RC. Granzyme B: a natural born killer. *Immunological Reviews.* 2003; 193: 31-38.

Machado P, Araujo C, Silva AT, et al. Failure of Early Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Preventing the Development of an Ulcer. *Clinical Infectious Diseases.* 2002; 34: 69-73.

Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol.* 2002; 12: 449-451.

Machado PR, Rosa MRA, Costa D, Mignac M, Silva JS, Schriefer A, Teixeira MM, Bacellar O, Carvalho EM. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated

leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105: 438 – 444.

Manzur A, Bari A. Sensitivity of leishmanin skin test in patients of acute cutaneous leishmaniasis. *Dermatology Online Journal.* 2006; 12:2.

Maretti-Mira AC, de Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, de Oliveira MP, Craft N, Pirmez C 2011. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin Exp Immunol.* 2010; 163: 207–214.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1986; 80: 859-876.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza WD. Reação de Imunofluorescência indireta e intradermo-reação para leishmaniose tegumentar americana em residentes da região de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo de resultados observados em 1974 e 1978. *Rev Inst Med Trop.* 1980; 22: 149-155.

Marzochi MCA & Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública.* 1994; 10: 359-375.

Mattos MS. Clinical, laboratorial and epidemiological aspects of American mucocutaneous leishmaniasis observed in Evandro Chagas Hospital - FIOCRUZ/RJ from january/1987 to december/1991. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1993; 26: 261-262.

McBride MO, Linney M, Davidson RN, Weber JN. Pancreatic necrosis following treatment of leishmaniasis with sodium stibogluconate. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 710.

Mello CX, Schubach AO, Oliveira RVC, Conceição-Silva F, Pimentel MIF, Lyra MR, Vasconcellos ECF, Madeira MF. Comparison of the sensitivity of *imprint* and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol Res.* 2011; 109: 927-933.

Mendonça MG, Britto MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC. Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? *The Journal of Infectious Diseases.* 2004; 189: 1018–1023.

Mendonça SC, Coutinho SG, Amendoeira RR, Marzochi MC, Pirmez C. Human American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. *Clin Exp Immunol.* 1986; 64: 269-276.

Meneses CR, de Azevedo AC, da Costa SM, Costa WA, Rangel EF. Ecology of American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J Vector Ecol.* 2002; 27: 207-214.

Miller, A. Role of IL-33 in inflammation and disease. *Journal of Inflammation.* 2011; 8:1-12.

Ministério da Saúde. DATASUS. SINAN. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LT-Casos.pdf>. Acesso em 28/10/2014.

Ministério da Saúde. DATASUS. SINAN. Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LT-Coef-Detec----o.pdf>. Acesso em 28/10/2014.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed atualizada: Ministério da Saúde. 2010: 180p.

Mitropoulos PDO, Konodas PD, Durkin-Konidas MPD. New world cutaneous leishmaniasis: Update review of current and future diagnosis and treatment. J Am Acad Dermatol. 2010; 63: 309-322.

Moreira JS. Estudo da laringite leishmaniótica. Tese. Departamento de Cirurgia. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 1994, 118 p.

Morgado FN, Schubach AO, Rosalino CMV, Quintella LS, GPL dos Salgueiro MM, Conceição-Silva F. Is the *in situ* inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? British Journal of Dermatology. 2008; 158: 50-58.

Morgado, FN, Schubach A, Vasconcellos E, Azeredo-Coutinho RB, Valeti-Rosalino CM, Quintella LP, et al. Signs Of An Inflammatory Reaction In Scars Of Human American Tegumentary Leishmaniasis. Parasite Immunology. 2010; 32: 285-295.

Morgado FN, Schubach AO, Barros MBL, Conceição-Silva F. The *in situ* inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis. Medical Mycology. 2011; 49: 612–620.

Munder M, et al. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. Blood. 2005; 105: 2549-2556.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). Am J Trop Med Hyg. 1997; 57: 651-655.

Palmeiro MR, Morgado FN, Valeti-Rosalino CM, Martins AC, Moreira J, Quintella LP, et al. Comparative study of the *in situ* immune response in oral and nasal mucosal leishmaniasis. Parasite Immunol. 2012; 34: 23-31.

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet. 2001; 357: 1777-1789.

Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. Clinical Infectious Diseases. 1996; 22: 1-13.

Pereira-Carvalho R, Mendes-Aguiar C, Oliveira-Neto MP, Covas CJF, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A. *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. 2013; 8: 1-8.

Pineda JA, Macías J, Morillas F, Fernández-Ochoa J, Cara J, de la Rosa R, et al. False-positive results of leishmanin skin test due to phenol-containing diluents. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001; 95: 173-174.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin R. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. J Clin Invest. 1993; 91: 1390-1395.

Quintella L, Cuzzi T, Madeira M, Okamoto T, Schubach AO. Immunoperoxidase Technique Using An Anti-Leishmania (L.) Chagasi Hyperimmune Serum In The Diagnosis Of Culture-Confirmed American Tegumentary Leishmaniasis. Rev Inst Med Trop. 2009; 51: 83-86.

Rodríguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Tariff, H., Bloom, B.R., Convit, J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. Journal of Clinical Microbiology. 1994; 32: 2246-2252.

Romero GA, Sampaio RN, Macedo V de O, Marsden PD. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94: 505-508.

Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO. 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. 2001; 65: 456-65.

Rozenfeld S, Pepe VLE. Guia Terapêutico Ambulatorial. Artes Médicas. 1992. Porto Alegre. Brasil.

Sabat R, Witte E, Witte K, Wolk K. IL-22 and IL-17: An Overview. Cytokine Growth Factor Rev. 2010; 21: 11-35.

Sadeghian G, Momeni A, Siadat AH, Usefi P. Evaluation of leishmanin skin test and its relationship with the clinical form and duration of cutaneous leishmaniasis. Dermatology Online Journal. 2006; 12: 3.

Saenz RE, de Rodriguez CG, Johnson CM, Berman JD 1991. Efficacy and toxicity of pentostam against Panamanian mucosal leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1983; 44: 394-398.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing Il-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J. Immunol. 1995; 155: 1151-1164.

Silveira FT, Lainson R, Corbett C. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99: 239-251.

Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97: 759-765.

Souza MA, Castro MC, Oliveira AP, Almeida AF, Almeida TM, Reis LC, et al. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microbiol Pathogenesis*. 2013; 57: 27-32.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.

Schubach AO. Estudo da evolução da leishmaniose tegumentar americana em pacientes tratados: medicina tropical. 1990. 141 p. Tese. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1990.

Schubach AO, 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.

Schubach AO, et al. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2005; 38: 213-217.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*. 2002; 186: 1829-1834.

Unger A, O'Neal S, Machado PRL, Guimarães LH, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Glesby MJ, Carvalho EM. Association of Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis Prior to Ulcer Development with High Rate of Failure in Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80: 574-579.

Veiga JP, Wolff ER, Sampaio RN, Marsden PD. Renal tubular dysfunction in patients with mucocutaneous leishmaniasis treated with pentavalent antimonials. *Lancet*. 1983; 2: 569-570.

Young HA, Hardy KJ. Role of interferon  $\gamma$  in immune cell regulation. *Journal of Leukocyte Biology*. 1995; 58: 373-381.

Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem Cells*. 1994; 12: 456-465.



## APÊNDICE

### TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Nós, Carla de Oliveira Ribeiro, aluna de mestrado, e Maria Inês Fernandes Pimentel, orientadora, do projeto de pesquisa intitulado “Estudo comparativo entre pacientes com leishmaniose tegumentar americana com resolução espontânea e aqueles que foram submetidos a tratamento específico no IPEC, FIOCRUZ”, comprometemo-nos a manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto.

A identidade dos participantes, assim como os resultados obtidos com este projeto, serão mantidos em um banco de dados sob a responsabilidade da orientadora.

Os resultados obtidos com esta pesquisa serão divulgados em comunicações científicas mantendo o anonimato dos participantes e o material utilizado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando abertos novos protocolos.

Rio de Janeiro,

---

Carla de Oliveira Ribeiro

---

Maria Inês Fernandes Pimentel

## ANEXOS

### Anexo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**INSTITUIÇÃO: INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – FIOCRUZ**

**COORDENADOR DA PESQUISA: ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH**

**ENDEREÇO: Av. Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21045-900**

**TELEFONES (0xx21) 3865-9525 / 3865-9609 FAX (0xx21) 3865-9541**

**NOME DO PROJETO DE PESQUISA: ESTUDO PARA A SISTEMATIZAÇÃO DO ATENDIMENTO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO CENTRO DE REFERÊNCIA EM LTA - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS - FIOCRUZ**

#### **NOME DO VOLUNTÁRIO:**

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença que atinge seres humanos e animais, incluindo o cão, causada por parasitos chamados Leishmanias. A doença é transmitida pelo "mosquito palha", que vive em regiões de mata, plantações de banana, manga etc. localizadas próximas às moradias humanas, onde costuma entrar para se alimentar de sangue de pessoas e animais domésticos. A LTA se apresenta como feridas na pele de difícil cicatrização. Algumas vezes, a LTA pode se tornar mais grave, envolvendo as mucosas de revestimento interno do nariz e da garganta, mesmo vários anos após a cicatrização da ferida na pele. Atualmente, não temos como saber qual paciente adoecerá de novo e qual permanecerá curado definitivamente.

Outras doenças como infecções por bactérias, tuberculose, sífilis, esporotricose, outras micoses, tumores etc. podem se manifestar de forma parecida com a leishmaniose e precisam ser diferenciadas para que se possa iniciar o tratamento correto. Entretanto, com os exames existentes atualmente, nem sempre se consegue ter certeza absoluta sobre qual a doença em questão.

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas como: de que outras maneiras a LTA pode se manifestar? como se comportam os exames de laboratório antes, durante e após o tratamento? quais pacientes, mesmo após o tratamento, irão

reabrir suas cicatrizes ou irão desenvolver doença dentro do nariz ou na garganta? que outras doenças parecidas estão sendo confundidas com a LTA e quais exames devem ser utilizados para esclarecimento? qual o papel dos seres humanos como reservatórios da doença? quais as melhores formas de tratamento? que medidas devem ser tomadas para controlar o problema?

Pelo presente documento, você está sendo convidado(a) a participar de uma investigação clínica a ser realizada no IPEC-Fiocruz, com os seguintes objetivos:

- Descrever aspectos da LTA: manifestações clínicas e exames de laboratório, tentando estabelecer padrões de apresentação da doença e seu modo de evolução, comparando com outras doenças.
- Avaliar o uso dos antimoniais e outras drogas utilizadas no tratamento da LTA levando em consideração o tempo de tratamento, toxicidade, facilidade de administração, custo e ausência de envolvimento das mucosas do nariz e da garganta.
- Isolar, identificar e comparar as leishmanias causadoras da LTA provenientes de diversas localidades.

Este documento procura esclarecê-lo sobre o problema de saúde em estudo e sobre a pesquisa que será realizada, prestando informações, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá recusar-se a participar de uma ou todas as etapas da pesquisa ou, mesmo, se retirar dela a qualquer momento, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte da Instituição. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar ou caso decida sair do estudo já iniciado. Os seus médicos poderão também interromper a sua participação a qualquer momento, se julgarem conveniente para a sua saúde.

A sua participação com relação ao Projeto consiste em autorizar a realização de uma série de exames para o diagnóstico da sua doença, e que parte deste material, assim como os resultados destes exames de rotina, sejam utilizados neste estudo. Também será necessária a sua autorização: 1) para a utilização de documentação fotográfica ou filmagem de suas lesões para estudo 2) para que parte do material coletado periodicamente para a realização de exames para acompanhamento da evolução da sua doença, assim como os resultados destes exames de rotina e do seu tratamento sejam utilizados neste estudo 3) para que parte das amostras coletadas seja estocada a fim de servir para outros estudos que tenham como finalidade a melhor compreensão da doença, o desenvolvimento e avaliação de novos métodos diagnósticos; avaliação da resposta ao tratamento etc., desde que tal estudo seja previamente analisado e autorizado por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Os exames e procedimentos aplicados lhe serão gratuitos. Você receberá todos os cuidados médicos adequados para a sua doença.

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir as instruções do seu médico; comparecer à unidade de saúde nas datas marcadas; relatar a seu médico todas as reações que você apresentar durante o tratamento, tanto positivas quanto negativas.

Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, procure o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz, mesmo fora do seu agendamento. Em caso de necessidade ligue para a Dra Cláudia Maria Valete Rosalino, Dra. Maria Inês Pimentel ou Dr. Armando de Oliveira Schubach, nos telefones acima. Caso você apresente qualquer quadro clínico que necessite de internação, a equipe médica providenciará seu leito no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz.

Sua identidade será mantida como informação confidencial. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e suas imagens poderão ser divulgadas desde que você não possa ser reconhecido. Entretanto, se necessário, os seus registros médicos estarão disponíveis para consulta para a equipe envolvida no estudo, para o Comitê de Ética em Pesquisa, para as Autoridades Sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo, assim como a qualquer momento durante o tratamento. O seu médico deverá oferecer todas as informações necessárias relacionadas à sua saúde, aos seus direitos, e a eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo.

#### **Procedimentos, exames e testes que serão utilizados:**

Antes do tratamento haverá coleta de informações sobre a doença; exame médico geral e exame da pele com descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões; exame interno do nariz e da garganta com um aparelho chamado fibra ótica, que permite ver lesões pequenas ou em locais de difícil acesso, para descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões (se necessário será aplicado "spray" anestésico local). Retirada, com anestesia local, de um pequeno fragmento de "íngua", de pele ou de mucosa (lesadas ou aparentemente sadias) para realização de exames tanto para diagnóstico (aspecto microscópico do tecido e culturas para tentativa de isolamento de possíveis agentes de doença como fungos, bactérias e leishmanias) quanto para pesquisa (identificação de células e outros componentes da resposta inflamatória, assim como novos métodos de identificação dos possíveis

agentes da doença). Outros materiais também poderão ser coletados na tentativa de isolamento do agente causador da doença: aspiração com seringa e agulha do bordo da lesão e de secreções em lesões de pele fechadas.

Outros exames também serão realizados para diagnosticar outras doenças possíveis de serem confundidas com a LTA, para classificar a gravidade da doença e avaliar os efeitos dos medicamentos a serem utilizados durante o seu tratamento: um a quatro testes cutâneos (injeção da décima parte de um mililitro de um reativo para determinada doença na pele da região anterior do antebraço, a qual deverá ser revista entre 2 a 3 dias após a injeção); exames de sangue (quantidade equivalente a aproximadamente três colheres de sopa), exame de saliva (coletada com um tipo de cotonete), radiografia dos pulmões e da face (se necessário complementada por tomografia computadorizada); eletrocardiograma; e audiometria e otoscopia.

O tratamento da LTA em pacientes humanos costuma ser com o medicamento glucantime por via intramuscular (IM), intravenosa (IV) uma injeção ao dia, geralmente, durante um período de 30 dias contínuos ou com intervalos de descanso. Excepcionalmente, para idosos, pacientes com doenças graves ou que não tolerem o tratamento normal, poderá ser utilizada a via intralesional (IL). O tempo do tratamento poderá ser diminuído ou aumentado conforme a necessidade. Outras opções de tratamento são a anfotericina B (IV) e a pentamidina (IM), ambas injetáveis e necessitando medidas de acompanhamento parecidas com as do glucantime.

Após o início do tratamento, você deverá comparecer a aproximadamente três consultas dentro de 10, 20 e 30 dias. Caso as lesões não cicatrizem totalmente, o tratamento poderá ser continuado pelo período de tempo necessário. Ao se atingir a cura clínica, você deverá retornar para consulta de reavaliação em 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o término do tratamento. E, a partir de então, pelo menos uma vez por ano durante um prazo indefinido (no mínimo 5 anos).

A cada retorno deverão ser realizados avaliação médica e exames de sangue (na quantidade aproximada de uma ou duas colheres de sopa) para avaliar os efeitos dos medicamentos utilizados no seu tratamento e/ou para avaliar a evolução da doença. Outros exames, como o eletrocardiograma durante o tratamento, poderão ser realizados quando indicados.

#### **Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais: [**

A coleta de sangue poderá causar alguma dor no momento da punção venosa e, eventualmente, poderá haver a formação de uma área arroxeadada no local, que voltará ao normal dentro de alguns dias.

Ocasionalmente, os testes na pele poderão, apresentar uma reação forte com

inflamação do local, formação de bolhas e, mais raramente, formação de ferida. Todo o processo costuma regredir dentro de alguns dias a poucas semanas.

Tanto os testes na pele quanto o anestésico injetado no momento da biópsia (retirada de um pequeno fragmento de pele para exame) poderão causar alergia, geralmente limitada ao aparecimento de áreas vermelhas, empoladas e com coceira na pele e que respondem bem a medicamentos anti-alérgicos. Mais raramente poderá haver uma reação mais severa com dificuldade de respirar e necessidade de cuidados mais intensos, existentes no IPEC.

No local da biópsia poderá ocorrer inflamação e dor, acompanhados ou não de infecção por bactérias. Caso isso ocorra, poderá ser necessário o uso de medicamentos para dor e antibióticos.

Os medicamentos glucantime e pentamidina costumam causar efeitos indesejáveis, não devem ser utilizados na gravidez e seu uso em mulheres em idade reprodutiva deve ser acompanhado de uso de método anticoncepcional eficaz como preservativo de látex masculino ou feminino ("camisinha"), diafragma feminino ou anticoncepcional oral ("pílula"). Quando o tratamento não puder ser adiado, a anfotericina B poderá ser utilizada na gravidez. Os exames com raios-x também não devem ser realizados em grávidas.

#### **Formas de ressarcimento:**

Sempre que necessário, nos dias de seu atendimento, poderá ser fornecida alimentação conforme rotina do Serviço de Nutrição e Serviço social do IPEC para pacientes externos.

#### **Benefícios esperados:**

Espera-se que, ao final do tratamento, você esteja curado da LTA, embora as consultas de retorno por vários anos após o tratamento sejam necessárias para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão ou não beneficiá-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas, pois espera-se também que este estudo contribua para que o diagnóstico e acompanhamento do tratamento de pacientes com LTA possa ser feito de forma mais eficaz e segura.

Caso a sua investigação demonstre outro diagnóstico diferente de LTA, você será devidamente orientado a buscar o tratamento mais adequado para o seu caso.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo de pesquisa.

---

Nome paciente:

Data

---

Nome médico:

Data

---

Nome testemunha:


Data

---

Nome testemunha<sup>2</sup>:

Data

## Anexo II

INSTITUTO DE PESQUISA  
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -   
IPEC / FIOCRUZ

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo comparativo entre pacientes com leishmaniose tegumentar americana com resolução espontânea e aqueles que foram submetidos a tratamento específico no IPEC, Fiocruz

**Pesquisador:** Maria Inês Fernandes Pimentel

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 19700413.6.0000.5262

**Instituição Proponente:** Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC / FIOCRUZ

**Patrocinador Principal:** Fundação Oswaldo Cruz  
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 470.231

**Data da Relatoria:** 11/11/2013

**Apresentação do Projeto:**

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa que representa um problema de saúde pública mundial e no Brasil. As diferentes formas clínicas observadas (leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea e mucocutânea e forma cutânea difusa anérgica). O aspecto clínico mais característico das lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar é semelhante e denominado leishmaniose cutânea localizada (LCL). Habitualmente, se não diagnosticada e tratada, a úlcera da leishmaniose cutânea evolui para cura espontânea em alguns meses. Esta é uma questão ainda não esclarecida. Há indicações com base em estudos em modelos experimentais e pacientes de que a resposta imune do hospedeiro seja determinante. Duas hipóteses surgem para a compreensão da ocorrência de resolução espontânea na LTA: 1. A carga parasitária é menor nestes casos levando ao menor estímulo da resposta imune específica; 2. A resposta imune local no paciente apresentando resolução espontânea da enfermidade tende ao equilíbrio com diminuição dos fenômenos de toxicidade celular e consequente destruição tecidual.

**Endereço:** Avenida Brasil 4365  
**Bairro:** Manguinhos  
**UF:** RJ  
**Telefone:** (21)3865-9585  
**Município:** RIO DE JANEIRO  
**CEP:** 21.045-900  
**E-mail:** cep@ipec.fiocruz.br



INSTITUTO DE PESQUISA  
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -  
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 470.231

Na LTA típica, as lesões são caracterizadas também pela intensa atividade de macrófagos ativados aos estágios parasitocidas através da predominância da resposta imune celular do tipo 1. O desequilíbrio nesta resposta para mais ou para menos produz lesões mais graves, respectivamente, lesões mucosas e a forma cutânea difusa. Assim, caracterizar a resposta inflamatória local, o tipo e a função celular das células envolvidas têm-se mostrado importantes na compreensão das diferentes apresentações clínicas de LTA. Partindo do conhecimento prévio da importância da resposta imune celular in situ na evolução da lesão de LTA e na crescente possibilidade de manejo da resposta imune em imunoterapias coadjuvantes, é importante a caracterização dos fatores que apresentam papel na evolução das lesões na LTA. Isto seria particularmente interessante, se fossem identificados fatores que conduzem à evolução das formas cutâneas localizadas para resolução espontânea. A caracterização da arquitetura da resposta inflamatória in situ pôde também indicar características que permitam o auxílio ao diagnóstico presuntivo nos casos em que o agente etiológico não pode ser evidenciado e os indivíduos infectados têm história compatível com LTA e esporotricose. Espera-se que este conhecimento auxilie no estabelecimento de parâmetros imunológicos que possam facilitar o diagnóstico e manuseio clínico dos pacientes, colaborando para um melhor conhecimento do comportamento da enfermidade.

Serão avaliados dados de características clínicas (tempo de evolução, número, aspecto, tamanho e localização das lesões), sociodemográficas (gênero, idade, procedência, etc) e de exames laboratoriais por ocasião do diagnóstico (IDRM, sorologia para leishmaniose - reação de imunofluorescência indireta e/ou ELISA para Leishmania, cultura e "imprint" para Leishmania, exame histopatológico e reação em cadeia da polimerase para Leishmania). Também será avaliada a resposta imune in situ por imunohistoquímica (IHQ) para identificação de células CD3, -CD4, -CD8, -CD22, -CD1a, -elastase neutrofílica e áreas positivas para os marcadores funcionais anti-CD69, -CD25, CD62E, -BC12, -KI67 e -CD68, -INOS, IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$ , -CLA, -FoxP3 e -FasL, nas lesões ativas de LCL de dois grupos de pacientes: (1) com resolução espontânea sem tratamento e; (2) com cura clínica após tratamento. Será realizada análise descritiva com medidas de tendência central e dispersão para as variáveis contínuas e medidas de proporção para as variáveis categóricas. Para os resultados de IHQ serão utilizados testes não paramétricos. O projeto apresentado se constitui em uma dissertação de mestrado do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, nos pacientes atendidos entre 2002 e dezembro de 2013, no Centro de Referência em Leishmaniose Tegumentar Americana desta instituição.

**Endereço:** Avenida Brasil 4365

**Bairro:** Manguinhos


**CEP:** 21.045-900

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3865-9585

**E-mail:** cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA  
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -   
IPEC / FIOCRUZ

Continuação do Parecer: 470.231

**Objetivo da Pesquisa:**

**OBJETIVO GERAL**

- Avaliar parâmetros clínicos, laboratoriais e o perfil da resposta imune celular in situ de pacientes apresentando LCL, com e sem regressão espontânea.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar as características clínicas (tempo de evolução, número, aspecto, tamanho e localização das lesões) e sociodemográficas (gênero, idade, procedência, etc) entre os pacientes com leishmaniose cutânea com resolução espontânea e aqueles que foram submetidos a tratamento específico.

- Descrever os resultados dos exames laboratoriais por ocasião do diagnóstico (IDRM, sorologia para leishmaniose - reação de imunofluorescência indireta e/ou ELISA para Leishmania, cultura e imprint para Leishmânia, exame histopatológico, reação em cadeia da polimerase para Leishmania), nos pacientes portadores de leishmaniose com resolução espontânea em relação aos casos submetidos a tratamento.

- Caracterizar a resposta imune celular in situ por imunohistoquímica nas lesões ativas de LCL comparando os resultados dos pacientes com resolução espontânea com aqueles obtidos nos pacientes que necessitaram de tratamento específico.

- Associar os achados in situ com os dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos.

- Estimar os fatores de risco (clínicos, laboratoriais e epidemiológicos) que expliquem a necessidade ou não de tratamento de pacientes com LCL.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os possíveis fatores de risco de cada etapa de procedimentos foram explicitados: a coleta de sangue poderá causar alguma dor no momento da punção venosa e, eventualmente, poderá haver a formação de uma área arroxeadada no local, que voltará ao normal dentro de alguns dias. Ocasionalmente, os testes na pele poderão, apresentar uma reação forte com inflamação do local, formação de bolhas e, mais raramente, formação de ferida. Todo o processo costuma regredir dentro de alguns dias a poucas semanas. Tanto os testes na pele quanto o anestésico injetado no momento da biópsia (retirada de um pequeno fragmento de pele para exame) poderão causar alergia, geralmente limitada ao aparecimento de áreas vermelhas, empoladas e com coceira na pele e que respondem bem a medicamentos anti-alérgicos. Mais raramente poderá haver uma reação mais severa com dificuldade de respirar e necessidade de cuidados mais intensos, existentes no IPEC e as possíveis repercussões

**Endereço:** Avenida Brasil 4365

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.045-900

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3865-9585

**E-mail:** cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA  
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -  
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 470.231

decorrentes do tratamento na gravidez. Consta do TCLE: como benefício: espera-se que, ao final do tratamento, você esteja curado da LTA, embora as consultas de retorno por vários anos após o tratamento sejam necessárias para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão ou não beneficiá-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas, pois espera-se também que este estudo contribua para que o diagnóstico e acompanhamento do tratamento de pacientes com LTA possa ser feito de forma mais eficaz e segura.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A proposta da dissertação é parte de um estudo mais amplo, que envolve o atendimento de pacientes com Leishmaniose tegumentar Americana no Centro de Referência em Leishmaniose do IPEC. Esta etapa que se constitui em uma dissertação de mestrado, visa procurar entender a questão da cura espontânea apresentada nestes indivíduos, em comparação a outros que necessitam de tratamento terapêutico, para que se atinga a cura da protozoose. Face ao desconhecimento da causa desta cura espontânea, a proposta bem fundamentada dos métodos de laboratório para avaliação e as perspectivas de resultado que poderão nortear os procedimentos terapêuticos em novos pacientes, apontam para a relevância do estudo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não há coincidência entre o título apresentado no TCLE (Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de referência em Leishmaniose Tegumentar Americana no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas CAAE 0016.0.009.000-02) e o título apresentado na folha de rosto (Estudo comparativo entre pacientes com leishmaniose tegumentar americana com resolução espontânea e aqueles que foram submetidos a tratamentos específicos no IPEC). A solicitante justifica essa diferença pelo fato dos pacientes do estudo terem atendido ao TCLE do projeto original (CAAE 0016.0.009.000-02). A inclusão do ANEXO III - TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE é adequada.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As respostas apresentadas atenderam às solicitações.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Endereço: Avenida Brasil 4365  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.045-900  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3865-9585 E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA  
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -  
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 470.231

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

RIO DE JANEIRO, 27 de Novembro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Léa Ferreira Camillo-Coura**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Avenida Brasil 4365

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.045-900

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3865-9585

**E-mail:** cep@ipec.fiocruz.br