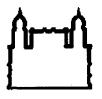


# UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA FACULDADE DE MEDICINA CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ



**UFBA** 

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**FIOCRUZ** 

Dissertação de Mestrado

Avaliação de marcadores clínicos e imunológicos associados ao prognóstico da evolução clínica e da resposta terapêutica na Leishmaniose Cutânea Localizada.

Luiz Fabiano Borges Oliveira

Salvador - Bahia - Brasil 2003



# UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA FACULDADE DE MEDICINA

# FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

## Curso de Pós-Graduação em Patologia

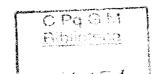
Avaliação de marcadores clínicos e imunológicos associados ao prognóstico da evolução clínica e da resposta terapêutica na Leishmaniose Cutânea Localizada.

Luiz Fabiano Borges Oliveira

Orientador: Aldina Barral

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental

Salvador - Bahia - Brasil 2003



# Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Oliveira, Luiz Fabiano Borges

O48a Avaliação de marcadores clínicos e imunológicos associados ao prognóstico da evolução clínica e da resposta terapêutica na Leishmaniose Cutânea localizada / Luiz Fabiano Borges Oliveira. Salvador: Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ, 2003. 85f.: il. tab.

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana)- Universidade Federal da Bahia, 2003.

1. Leishmaniose cutânea. 2. Imunologia. 3. TNF-α 4. Prognóstico. I.Título.

CDU 616.993:577.27

046.9499 113 8 1

# AVALIAÇÃO DE MARCADORES CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS AO PROGNÓSTICO DA EVOLUÇÃO CLÍNICA E DA RESPOSTA TERAPÊUTICA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA

#### LUIZ FABIANO BORGES OLIVEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus Professora Adjunta

FAMED - UFBA

Dr. Luiz Antônio R. de Freitas Pesquisador Titular

CPqGM - FIOCRUZ

Dra. Aldina Barral Pesquisador Titular CPqGM - FIOCRUZ " Vocatus atque non vocatus, Deus aderit."

Dr. C.G Jung -Escrito sobre a porta de sua casa em Kusnacht; Também foi transcrito no seu epitáfio.

"Multipliquei-me, para me sentir
Para me sentir precisei sentir tudo,
Transbordei, não fiz senão extravasar-me,
Despi-me, entreguei-me
E há em cada canto da minha alma
um altar a um Deus diferente

Sentir tudo de tôdas as maneiras,

Ter tôdas as opiniões,

Ser sincero contradizendo-se a cada minuto,

Desagradar a si próprio pela plena liberalidade de espírito,

E amar as coisas como Deus.

Eu, enfim, que sou diálogo contínuo,
Um falar-alto incompreensível, alta-noite na tôrre,
Quando os sinos oscilam vagamente sem que mão lhes toque
E faz pena saber que há vida que viver amanhã.

Eu, sinto que ficou fora do que imaginei tudo o que quis,
Que embora eu quisesse tudo, tudo me faltou.."

Álvaro Campos

#### **AGRADECIMENTOS**

Aldina Barrai e Manoel Barral-Netto

Pela orientação, paciência e pela convivência que é uma escola a cada dia.

Claudia Brodskyn e Camila Indiani de Oliveira

Pelo convívio sempre divertido e enriquecedor

Aos Amigos do laboratório

Por me agüentarem todos os dias, independente do meu humor.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, pelo apoio desde a iniciação cientifica, onde fui acolhido e sempre me senti em casa. Agradecimento especial a todos os funcionários do CPqGM, pela disponibilidade e eficácia no atendimento das solicitações.

Ao PRONEX, CNPq, Instituto de Investigação em Imunologia e CAPES.

#### **DEDICATORIA**

Aos Meus pais e Família

Pelo apoio e compreensão

Aos Amigos em especial a Chica, Nando, Binha, Na, Rê, Lú e Tia Elza que sempre estiveram próximos, e com quem eu sempre pude contar em todas as horas.

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE GRÁFICOS	XIV
RESUMO	xv
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana	1
1.2 Características clínicas da LTA	3
1.3 Diagnóstico laboratorial da LTA	7
1.4 Histopatologia da LTA	8
1.5 Tratamento da LTA	9
1.6 Resposta imune na LT	10
2 OBJETIVO	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 JUSTIFICATIVA	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Descrição da área de estudo	17
4.2 Pacientes	18
4.3 A amostra de estudo	20

4.4 Critérios de inclusão	20
4.5 Critérios de exclusão	21
4.6 Critérios Éticos	22
4.7 Biópsia e histopatologia	22
4.8 Reação de Montenegro	23
4.9 Re-estimulação in vitro	23
4.10 Dosagem de citocinas	24
4.11 Análise estatística	24
5 RESULTADOS	26
5.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes	26
5.2 Produção de citocinas IFN-γ, TNF-α e IL-10	28
5.2 Análise de correlação entre as variáveis clínicas	29
5.3 Correlação entre as variáveis clínicas e imunológicas	32
5.4 Correlação entre os dados imunológicos	33
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÃO	48
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
9 ANEXOS	68
9.1 Anexo 1	68
9.2 Anexo 2	69
9.3 Anexo 3	70
9.4 Anexo 4	76
9.5 Anexo 5	78

#### Lista de Abreviaturas

ASL Antígeno solúvel de Leishmania

CD Código de diferenciação (Cluster differentiation)

CMSP Células mononucleares do sangue periférico

EGF Fator de crescimento da epiderme (Epidermal growth factor)

ELISA Ensaio imunoenzimático (Enzyme immunosorbent assay)

IDRM Intradermo-reação de Montenegro

IFN Interferon

lg lmunoglobulina

IL Interleucina

LCD Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL Leishmaniose Cutânea Localizada

LM Leishmaniose Mucosa

LTA Leishmaniose Tegumentar Americana

MMII Membros inferiores

MMSS Membros superiores

NK Natural killer

PDGF Fator de crescimento derivado de plaquetas (Platelet-derived growth

factor)

RT-PCR Reação em cadeia da polimerase (Reverse transcriptase-Polimerase

chain reaction)

Th Linfócito T auxiliador (T helper)

TGF Fator transformador de colônia (Transforming growth factor)

TNF Fator de necrose tumoral (Tumor necrosis factor)

# Lista de Figuras

Figura I - Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) notificados no Brasil no períod	lo
de 1970 – 2001	.2
Figura II - Média de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) por municípios -	
Brasil, 1998 a 2000.	.2
Figura III - Mapa do estado da Brasil, Bahia e região de estudo indicando as cidades de onde os	
pacientes provieram.	18

### Lista de Gráficos

Gráfico 1. Correlação direta entre o tamanho da lesão em cm e o tempo de cura em
dias29
Gráfico 2 - Correlação direta entre o tamanho da lesão e o número de séries de
antimonial pentavalente
Gráfico 3- Correlação direta entre a idade em anos e o tamanho da lesão (cm) 31
Gráfico 4 – Correlação direta entre a produção de TNF- $lpha$ em pg/ml das CMSP re-
estimuladas com antígeno bruto de <i>Leishmania</i> e a idade em anos
Gráfico 5- Correlação direta entre a produção de TNF-α e IFN-γ em pg/ml, das CMSP
re-estimuladas com antígeno bruto de <i>Leishmania</i>
Gráfico 6 Correlação direta entre a produção de IL-10 e TNF-α em pg/ml, das CMSP
re-estimuladas com antígeno bruto de <i>Leishmania</i> 34
Gráfico 7 – Correlação direta entre a produção de IL-10 e IFN-γ em pg/ml, das CMSP
re-estimuladas com antígeno bruto de <i>Leishmania</i> 35
Gráfico 8 - Correlação direta entre os níveis TNF-α plasmático e IFN-γ plasmático em
pg/ml36
Gráfico 9 - Correlação entre os níveis TNF-α plasmático e IL-10 plasmático em pg/ml.

#### **RESUMO**

AVALIAÇÃO DE MARCADORES CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS AO PROGNÓSTICO DA EVOLUÇÃO CLÍNICA E DA RESPOSTA TERAPÊUTICA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA. LUIZ FABIANO BORGES OLIVEIRA. [INTRODUÇÃO] A leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença endêmica no Brasil com uma incidência anual de 30 mil novos casos. Grande parte dos estudos recentes na LTA é sobre as formas mais raras e atípicas, como a forma difusa e a mucosa. Nosso objetivo foi observamos se há relação entre os parâmetros clínicos e imunológicos com o prognóstico e a resposta terapêutica na Leishmaniose Cutânea Localizada com a lesão típica. [MATERIAL E MÉTODOS] Neste estudo observacional de coorte prospectivo foram selecionados pacientes de uma área endêmica de L. braziliensis que apresentavam a lesão típica tratados com a terapêutica padrão e que tiveram uma resposta favorável evoluindo para a cura. Os dados clínicos e as citocinas (IFN-y, TNF-α, IL-10) após re-estimulação in vitro ou diretamente do plasma foram mensurados na primeira consulta e os pacientes acompanhados até a cura. [RESULTADOS] Observamos que o tamanho da lesão se correlaciona diretamente com o tempo de cura e a resposta terapêutica. Houve uma correlação direta entre o tamanho da lesão a idade, e a produção de TNF-α após re-estimulação. As citocinas produzidas in vitro (IFN-y, TNF-a, IL-10) correlacionam-se diretamente entre si, e o TNF-a plasmático correlacionou-se diretamente com o IFN-y e com a IL-10 plasmáticos. [CONCLUSÃO] Estes dados indicam que o tamanho da lesão, em conjunto com as citocinas dosadas na primeira consulta e a idade, podem ser utilizados como auxiliares no prognóstico do paciente.

[PALAVRAS-CHAVE] Leishmaniose. Leishmaniose Cutânea Localizada. Clínica. Imunologia. Prognóstico.

#### **ABSTRACT**

Immunological. Prognostics.

EVALUATION OF CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL MARKERS ASSOCIATED TO PROGNOSTIC AND THERAPEUTIC RESPONSE IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS. LUIZ FABIANO BORGES OLIVEIRA. [INTRODUCTION] Cutaneous Leishmaniasis (CL) is an endemic disease in Brazil with 30,000 new cases registered annually. The major parts of the recent papers about CL are focus on the rare and atypical presentations of the disease, as the Diffuse Cutaneous Leishmaniasis and Mucosal Leishmaniasis. Our aim is the evaluation of clinical and immunological markers with the outcome and therapeutic response in the Localized Cutaneous Leishmaniasis (LCL) patients with the typical presentation. [MATERIAL AND METHODS] A prospective observational cohort study was performed selecting patients of an endemic area with a predominance of L braziliensis infection. The patients selected presented a typical lesion of LCL. Clinical and immunological evaluation was performed at the patients treated with the standard therapy, and had a successful outcome with healing of the ulcer. The clinical data and the level of cytokines (IFN-y, TNF-a, IL-10) measured in the plasma or after in vitro stimulation were obtained at the first physician appointment. The patients were then following up until the healing of ulcer. [RESULTS] Our data shows that the lesion size was directly correlated with the time of healing and therapeutic response. There were a direct correlation between the lesion size and the age of the patients, as well as the TNF-α levels in vitro. TNF-α levels were directly correlated with the levels of IFN-γ and IL-10 after in vitro stimulation. TNF-α plasma levels were directly correlated with the plasma levels of IL-10 and IFN-y. [CONCLUSION] The present study shows that lesion size is the best parameter to predict the outcome and the therapeutic response in typical LCL. Additionally, this parameter associated with the cytokine and patient age and could help the physicians in the prognostics of the definition patients with CL. Clinical. [KEY WORDS] Leishmaniasis. Localized Cutaneous Leishmaniasis.

## 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* (anexo 1), transmitida através da picada de insetos infectados do gênero *Lutzomyia*. É um problema de saúde pública sendo diagnosticada em 88 países, embora 90 % dos casos ocorram no Afeganistão, Argélia, Irã, Peru, Arábia Saudita, Síria e Brasil. Estima-se que entre 1-1,5 milhões de novos casos de LT sejam relatados anualmente (WHO, 2000).

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é endêmica, sendo registrados cerca de 30 mil novos casos por ano, atingindo todos os estados brasileiros. Encontra-se em franca expansão geográfica e o número de casos novos tem aumentado no decorrer dos últimos anos (figura I). A transmissão é focal, com uma forte concentração em algumas áreas, formando os chamados circuitos de produção da doença (SABROZA, 2002) (figura II).

A região Norte do Brasil contribui com 34,9 % dos casos registrados no período de 1998-2000, seguidos pelas regiões Nordeste e Centro-Oeste. Na região Nordeste, o estado do Maranhão tem o maior coeficiente de detecção de casos, seguido pelo Ceará e Bahia (CENEPI, 2000).

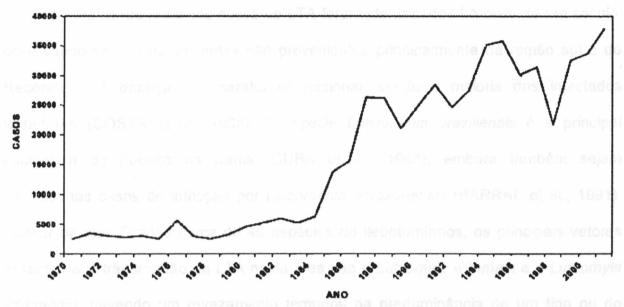


Figura I - Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) notificados no Brasil no período de 1970 – 2001. Fonte CENEPI/FUNASA/MS

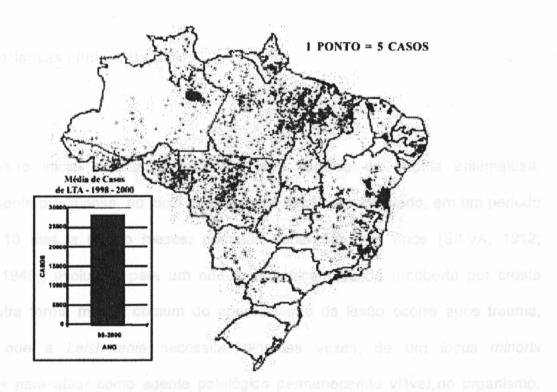


Figura II - Média de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) por municípios – Brasil, 1998 a 2000.

Na Bahia, os primeiros casos de LTA foram identificados há mais de um século, observando-se que os pacientes são provenientes principalmente da região sul e do Recôncavo. A doença tem caráter ocupacional, sendo a maioria dos infectados lavradores (COSTA et al., 1988). A espécie *Leishmania braziliensis* é a principal causadora da doença na Bahia (CUBA et al., 1984), embora também sejam identificados casos de infecção por *Leishmania amazonensis* (BARRAL et al., 1991). Apesar de identificadas cerca de 40 espécies de flebotomíneos, os principais vetores associados à transmissão da LTA nesta área são o *Lutzomyia withmani* e o *Lutzomyia intermédia*, havendo um revezamento temporal na predominância de um tipo ou do outro (VEXENAT et al., 1986; SANTOS et al., 1993; FOLLADOR et al., 1999).

#### 1.2 Características clínicas da LTA.

A lesão inicial caracteriza-se como uma espécie de pápula eritematosa, freqüentemente pruriginosa, no local da picada do flebótomo infectado, em um período médio de 18 dias a quatro meses, podendo variar até dois anos (SILVA, 1912; PESSOA, 1948), evoluindo para um nódulo que úlcera sendo recoberto por crosta central. Outra forma menos comum do aparecimento da lesão ocorre após trauma, sugerindo que a *Leishmania* necessita, algumas vezes, de um *locus minoris resistenciae* para atuar como agente patológico permanecendo viável no organismo, sem causar a lesão (WEISS, 1943).

Outro evento comum é a linfadenopatia, quase sempre presente nas lesões iniciais (PESSOA, 1939; BARRAL et al., 1992). Em alguns pacientes é observada a ocorrência da adenopatia regional precedendo a lesão leishmaniótica, ou mesmo sendo a única manifestação da doença (BARRAL et al., 1995).

Dentre as classificações existentes para a LTA, utilizamos a de Marzochi (MARZOCHI, 1994) recomendada pelo Ministério da saúde (CENEPI, 2000), como seque abaixo:

Leishmaniose cutânea inaparente ou grupo subclínico:
 Indivíduos com ausência de lesão cutânea (ativa ou curada), com intradermo-reação de Montenegro (IDRM) positiva e testes sorológicos ocasionalmente positivos.

#### 2. Grupo Cutâneo:

- a. Forma cutânea localizada (LCL): lesão Tegumentar única ou múltipla, geralmente ulcerada, próxima ao sítio de inoculação.
   IDRM é positiva e a sorologia ocasionalmente positiva. O tratamento é efetivo e a cura espontânea é freqüente.
- b. Forma cutânea disseminada: lesões cutâneas múltiplas, geralmente pequenas e ulceradas, distantes do sítio de inoculação, a IDRM é negativa ou positiva e a sorologia é positiva. O tratamento geralmente é efetivo.
- c. Forma cutânea difusa (LCD): lesões cutâneas nodulares e/ou papulares múltiplas e não ulceradas, distantes do sítio de

inoculação. IDRM é negativa e a sorologia é positiva. O tratamento é difícil ou ineficaz.

#### 3. Leishmaniose Mucosa (LM):

- a. Forma mucosa tardia: lesões mucosas na via oro-respiratória classicamente associadas a lesões cutâneas cicatrizadas, após cura espontânea ou tratamento insuficiente. IDRM fortemente positiva e sorologia positiva. Tratamento é efetivo e deve ser prolongado.
- b. Forma mucosa de origem indeterminada: lesão mucosa clinicamente isolada, sem evidência de LTA previa. IDRM e sorologia são positivas. Tratamento prolongado é efetivo.
- c. Forma mucosa primária: lesões mucosas de lábios e genitais que foram infectadas por exposição ao vetor, ou por contaminação direta, tegumento a tegumento. IDRM é positiva e a sorologia ocasionalmente positiva.

#### 4. Leishmaniose mucocutânea:

- a. Forma mucocutânea simultânea: lesões cutânea e mucosa, ambas simultâneas e distantes. IDRM e sorologia fortemente positiva.
   Tratamento prolongado é efetivo.
- b. Forma mucocutânea por contigüidade: lesão mucosa por contigüidade de uma lesão cutânea ativa ou cicatrizada. IDRM é

positiva e a sorologia ocasionalmente positiva. Tratamento prolongado é efetivo.

#### 5. Leishmaniose ganglionar.

O grupo é caracterizado pela presença de linfadenopatia, havendo induração ou não de linfonodo satélite na ausência de lesão cutânea.

A lesão típica da LTA é a LCL, sendo identificada em 74% a 82,2% dos pacientes em séries de casos realizados em diversas regiões do Brasil (BARROS, 1982; LLANOS-CUENTAS et al., 1984; FOLLADOR et al., 1999). Os pacientes apresentam mais freqüentemente uma úlcera única, arredondada ou ovóide, indolor, com bordas elevadas, em moldura, fundo granuloso e avermelhado, algumas vezes com aspecto necrótico, freqüentemente localizada nos membros inferiores (CARINI, 1909; LINDENBERG, 1909; PESSOA, 1948; MARSDEN, 1986).

O diagnóstico clínico das lesões típicas não oferece dificuldade ao profissional médico, mas quando a LTA desenvolve-se de formas diferentes como com aspecto vegetante, verrucóide ou linfangítica, por exemplo, o diagnóstico diferencial se faz necessário com outras doenças, como tuberculose cutânea, úlceras traumáticas, úlceras de estase, anemia falciforme, piodermites, cromomicose, neoplasias cutâneas, sífilis, esporotricose, paracoccidiodomicose, etc (CENEPI, 2000).

#### 1.3 Diagnóstico laboratorial da LTA

O diagnóstico laboratorial pode ser feito pela demonstração do parasito, de reações sorológicas ou pela intradermo-reação. A demonstração do parasito pode ser feita através de métodos diretos como a biópsia, punção, esfregaço da lesão, isolamento da *Leishmania* por cultivo em meios enriquecidos (NNN – Nicole, Novy e McNeal), ou por inoculação em animais susceptíveis ( hamster – mesocricetus auratus, por exemplo)(PESSOA, 1948). A positividade dos testes parasitológicos varia com a experiência e habilidade do executante e também com a duração da lesão, sendo que lesões mais recentes apresentam maior índice de positividade (BUSS, 1929).

Nas reações sorológicas são utilizadas comumente a imunofluorescência indireta ou teste imunoenzimático (ELISA), objetivando a identificação de imunoglobulinas específicas contra antígenos da *Leishmania*. A sensibilidade encontrada é > 90% para o diagnóstico da leishmaniose visceral (SENALDI et al., 1996; BAGCHI et al., 1998) sendo que a sensibilidade e especificidade são menores para a LTA (GARCIA-MISS et al., 1990; SANCHEZ et al., 1992). Reações cruzadas com doenças de Chagas, tripanossomíase africana, hanseníase e tuberculose também são relatadas (ROFFI et al., 1980).

A IDRM consiste em uma reação de hipersensibilidade a proteínas da *Leishmania*, utilizada em humanos desde 1926 (MONTENEGRO, 1926, 1926b). O teste apresenta alta sensibilidade e especificidade, sendo sua realização de grande valor, tanto para o diagnóstico clinico, como para a realização de inquéritos epidemiológicos (PESSOA, 1941; PELLEGRINO et al., 1977).

#### 1.4 Histopatologia da LTA

O quadro histopatológico esperado na LT é traduzido por um infiltrado celular histiolinfoplasmocitário, amiúde acompanhado por reação granulomatosa, que compromete o derma nas lesões cutâneas, ou o córion nas lesões mucosas (MAGALHÃES, 1982). Há eosinófilos e mastócitos em freqüências variáveis. A plasmocitose e a necrose tecidual são eventos bastante comuns, sendo a necrose tecidual encontrada principalmente em três tipos básicos, sendo estes, a necrose granulomatosa (numerosos neutrófilos no seio da lesão), tipo poeira nuclear (a área de necrose está desprovida de células, exibindo apenas detritos celulares) e tipo eosinofílico (entremeada por filamentos de fibrina) sendo raro em lesões cicatrizadas (PESSOA, 1948; MARROQUIM, 1957; AZULAY, 1960; BITTENCOURT, 1967; RIDLEY, 1979; SANGUEZA & CARDENAS, 1981; MAGALHĀES, 1982). A plasmocitose, quando presente em lesões em via de cura ou cicatrizadas, denota tendência à recidiva e esta pode ser correlacionada com a presença de imunoglobulinas no sítio da lesão, não se observando o mesmo em relação com os níveis séricos de imunoglobulinas (MAGALHÃES, 1986). A presença de parasitos varia com a duração da lesão, sendo frequente este achado nas lesões inicias e raro nas lesões antigas (MONTENEGRO, 1924; PESSOA, 1948; MARROQUIM, 1957). Diversas classificações histopatológicas foram propostas e tentativas de correlação com dados clínicos e respostas terapêuticas foram concebidas, mas observou-se que biópsias de locais diferentes em uma mesma lesão apresentam diferentes aspectos histopatológicos, sendo classificadas diferentemente, indicando que os critérios histopatológicos não podem isoladamente

estabelecer prognóstico clinico e resposta terapêutica (BITTENCOURT & BARRAL, 1991).

A LCD apresenta padrões peculiares de resposta ao parasito, sendo classificados como um padrão polar não responsivo, onde são observados macrófagos intensamente parasitados e vacuolizados, com poucos linfócitos e plasmócitos e sem a presença de reação granulomatosa, e outro subpolar onde foram observados fracos sinais de resposta ao parasito (BARRAL et al., 1995).

#### 1.5 Tratamento da LTA

O tratamento padrão recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é o antimonial pentavalente (Sb<sup>+5</sup>) – antimoniato-N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio nas doses de 10 a 20 mg/ Sb<sup>+5</sup>/Kg/dia durante 20 a 40 dias. A droga pode ser administrada por via parenteral, intravenosa ou intramuscular.

Vários efeitos colaterais são relatados, a exemplo de artralgia, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, etc. Em casos de lesões de laringe e faringe há o risco de obstrução e insuficiência respiratória aguda durante o processo de cicatrização da lesão (COSTA et al., 1986).

O tratamento é proscrito em pacientes gestantes, e existem restrições a pacientes portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas, sendo necessária á avaliação semanal da função renal, de enzimas hepáticas,

leucograma e eletrocardiograma. Em áreas de prevalência da infecção pela *Leishmania* braziliensis cerca de 50% dos pacientes necessitam da repetição da dosagem após a utilização de 20mg/kg/dia de Sb<sup>+5</sup> durante 20 dias (ROMERO et al., 2001).

Caso seja caracterizada a falha terapêutica com o uso do Sb<sup>+5</sup>, deve ser analisado o tratamento com drogas alternativas, sendo a droga de segunda escolha a Anfotericina B e as Pentaminidinas (KOFF & ROSEN, 1994; CENEPI, 2000). Muitos ensaios clínicos com novas abordagens terapêuticas têm sido realizados, apresentando sucesso relativo, permanecendo ainda uma lacuna a ser preenchida por uma droga com menos efeitos colaterais, de baixo custo e administração simplificada, evitando o abandono do tratamento pelos pacientes e desonerando o sistema público de saúde.

#### 1.6 Resposta imune na LT

A resposta imune humana na LT é bastante complexa e seus mecanismos permanecem por serem elucidados. O quadro histopatológico na LTA sugere a presença de dois componentes na resposta anti-Leishmania humana, uma resposta por imuno-complexos associada a resposta humoral e outra que pode ser caracterizada como de hipersensibilidade tardia associada a imunidade celular (BITTENCOURT, 1967; VERESS & EL HASSAN, 1986).

O estudo das diferentes formas clínicas vem contribuindo para a compreensão da resposta imune humana anti-*Leishmania*. A LM, considerada a forma hiperérgica da doença, caracteriza-se por escassez de parasitos na lesão, reação imune exacerbada

com intensa destruição tecidual. Na LCD, considerada a forma anérgica da LT, há a presença de inúmeros macrófagos abarrotados de parasitas, pouca destruição tecidual, sendo que as lesões praticamente não apresentam necrose e ulcerações (CONVIT et al., 1972; CASTES et al., 1983). Na LCL há uma reação de intensidade intermediária, o equilíbrio entre a reação de destruição tecidual e uma eficiente contenção do parasita.

A citocina cardeal na resposta imune anti-Leishmania é o IFN-y atuando na ativação de macrófagos humanos, aumentando a sua atividade leishmanicida (MURRAY et al., 1983; NATHAN et al., 1983). A produção do IFN-y em culturas de linfócitos re-estimulados com ASL (antígeno solúvel de Leishmania) coletados de pacientes com LCD foi praticamente abolida, e após resposta favorável do tratamento destes pacientes a expressão desta citocina foi restaurada (CASTES et al., 1988; BOMFIM et al., 1996). Na LM são detectadas concentrações mais elevadas de IFN-y em sobrenadantes de culturas de CMSP estimuladas com antígeno de ASL do que na LCL. Estes achados sugerem que um papel duplo do IFN-y associado a cura com eficiente destruição dos parasitas, entretanto, também relacionado à destruição tecidual (CARVALHO et al., 1985). Quadro semelhante se repete no padrão de citocinas na lesão, identificadas por técnicas de RT-PCR, onde observa-se que na LM e na LCL existe uma expressão predominante de IFN-y sobre a IL-4, enquanto que, na LCD observamos a expressão de IL-4 sobrepujando a de IFN-γ (CACERES-DITTMAR et al., 1993). A razão da produção de IFN-y/IL-4 após re-estimulação in vitro é menor em pacientes infectados por Leishmania major que não curam das lesões após 2 anos de história de lesão, do que em pacientes que curam rapidamente, corroborando com o

raciocínio de que o IFN-γ atua na resposta contra o parasita e a IL-4 com um papel inverso (AJDARY et al., 2000).

O TNF-α está presente na LM e nas formas severas da LCL (CASTES et al., 1993; DA-CRUZ et al., 1996), a sua produção na LM tem sido associada a presença de células CD4<sup>+</sup> (BACELLAR et al., 2002) e a redução dos níveis de TNF-α após terapia efetiva (DA-CRUZ et al., 1996; LESSA et al., 2001) na LM sugerem a participação do TNF-α na destruição dos parasitas já que existe escassez dos mesmos na LM, o que contudo, também implica na sua participação na destruição tecidual que é evidente nestas formas clínicas. Utilizando a imunohistoquímica foi observado que na LCL e na LM o TNF-α está presente, estando ausente na LCD (SILVA, 1999), onde existe abundância de parasitos e não há observação de destruição tecidual ou fenômenos necrôticos. Entretanto, não foi observado diferenças na intensidade de detecção de RNAm na LCL e LM podendo o TNF não estar diretamente implicado com a destruição tissular, embora sua presença também esteja relacionada ao tempo de duração das lesões (CACERES-DITTMAR et al., 1993; MELBY et al., 1994). Recentemente a pentoxifilina, um inibidor do TNF-α, tem sido adicionada com sucesso ao tratamento padrão de formas refratárias de LM (LESSA et al., 2001), embora existam questionamentos sugerindo outras ações leishmanicidas da pentoxifilina que não a sua inibição sobre o TNF-α.

A IL-10 está associada com a cronicidade das lesões (MELBY et al., 1994), e sua expressão na lesãol está relacionada com uma pobre resposta ao tratamento em pacientes infectados com *Leishmania guyanensis* (BOURREAU et al., 2001). Na LCD existe uma elevada expressão de IL-10 e na LCL há uma expressão diminuída na lesão

ou após re-estimulação *in vitr*o de mononucleares (CACERES-DITTMAR et al., 1993; BOMFIM et al., 1996), embora na LCD os dados sejam conflitantes com achados de reduzida expressão de IL-10 na lesão por outros autores (PIRMEZ et al., 1990). Pacientes com LCD e com resposta favorável ao tratamento mostraram uma redução na expressão de IL-10 por mononucleares re-estimulados com ASL (BOMFIM et al., 1996). Portanto, a IL-10 pode estar contribuindo para a manutenção do parasíta no interior de macrófagos, e modulando negativamente a produção de citocinas do padrão Th1, contribuindo para a manutenção da lesão. Na LM existe uma reduzida expressão do gene de IL-10 por mononucleares re-estimulados *in vitro* (BACELLAR et al., 2002), o que pode sugerir a importância da IL-10 na regulação da resposta imune, evitando a destruição tecidual exacerbada.

Estudos *in vitro* demonstraram que o TGF-β é capaz de aumentar a infecção de macrófagos humanos pela *Leishmania braziliensis* (BARRAL et al., 1995). O TGF-β foi detectado em biopsias de lesões tardias em intensidade maior que em lesões recentes, sugerindo um papel desta citocina na cronicidade das lesões (MELBY et al., 1994).

As células que participam do infiltrado inflamatório são a provável fonte de produção destas citocinas. Os linfócitos constituem 50% das células presentes nos infiltrados das lesões de LCL e de 60% na LM, com predomínio de LT CD4<sup>+</sup> na LCL e equilíbrio entre LT CD4/CD8<sup>+</sup> na LM (SILVA, 1999). A atividade citotóxica de células NK e LT CD8 *in vitro* é maior na LM que na LCL e pode ser abolida pelo tratamento com anticorpo neutralizante de IFN-γ ou IL-12, sugerindo a participação destas células e citocinas não só no controle do parasita, mas na destruição tissular (BRODSKYN et al., 1997). Na LCD apenas 10% das células são linfócitos (SILVA, 1999).

A resposta humoral anti-Leishmania é mediada por anticorpos das classes IgG, IgM e IgA. A presença de plasmocitose e de anticorpos em quantidade considerável no sítio da resposta inflamatória pode contribuir opsonizando parasitas e antígenos, levando à ocorrência de fenômenos necróticos que representam mecanismos eficazes de redução da carga parasitária (RIDLEY, 1979; MAGALHÃES, 1982, 1986). Podendo desta forma contribuir na contenção e eliminação do parasito.

#### 2 OBJETIVO

#### 2.1 Objetivo Geral

Nosso objetivo é estudar as correlações entre as variáveis clínicas e os níveis de citocinas IFN-γ, TNF-α e IL-10, aferidos na primeira consulta, que possam auxiliar no prognóstico do paciente e no sucesso da resposta terapêutica.

Hipótese: Há relação entre parâmetros clínicos e imunológicos com o prognóstico e a resposta terapêutica na LCL.

#### 2.2 Objetivos Específicos

Identificar possíveis <u>marcadores clínicos</u> ou <u>imunológicos</u> na primeira consulta de pacientes com a lesão típica da LT.

- <u>Marcadores clínicos</u>: Tamanho da lesão, duração da lesão.
- <u>Marcadores imunológicos</u>: IFN-γ, TNF-α e IL-10 no plasma ou após cultura de CMSP.

#### **3 JUSTIFICATIVA**

A compreensão da resposta imune contra o parasito e sua correlação com os dados clínicos dos pacientes pode contribuir na conduta clínica adotada diante de pacientes com LTA. Não obstante a grande diversidade de formas clínicas da LTA, a maior parte dos pacientes numa área endêmica apresenta a forma LCL com a apresentação de uma lesão típica. Entretanto a maioria dos estudos publicados tem o seu foco nas formas polares de reação de hipersensibilidade a infecção pela leishmania, ou seja, na LM onde existe uma resposta hiperérgica e na forma LCD com uma resposta anérgica.

Portanto acreditamos que estudando pacientes com a lesão típica e que curaram em tempos variados após o tratamento padrão, através das correlações entre os níveis das citocinas produzidas após re-estimulação *in vitro* com ASL, as citocinas no plasma e as variáveis clínicas (tamanho da lesão, duração da lesão), todos aferidos na primeira consulta poderemos compreender a inter-relação entre estas variáveis e definir parâmetros clínicos e imunológicos que podem ser utilizados para auxiliar o prognóstico da lesão e resposta terapêutica na LCL.

#### 4.1 Descrição da área de estudo

O estudo foi desenvolvido em parceria do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ – Salvador, Bahia) com o Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Sílva (CERDEPS – PIEJ), localizado na cidade de Jequié, a 360 km de Salvador, Sudoeste da Bahia, Brasil. O PIEJ atua no atendimento da demanda espontânea ou referenciada por profissionais de saúde dos indivíduos residentes na 13º diretoria regional de saúde (DIRES) e municípios adjacentes. A 13º DIRES é composta por 24 municípios do sudoeste baiano, sendo eles: Aiquara, Apuarema, Barra do Rocha, Boa Nova, Cravolândia, Dârio Meira, Ibirataia, Ipiaú, Irajuba, Iramaia, Itagi, Itagiba, Itaquara, Itiruçu, Jaguaquara, Jequié, Jiquiriça, Jitauna, Lafaiete Coutinho, Lajedo do Tabocal, Manoel Vitorino, Maracás, Mirante, Planaltino e Santa Inês, compreendendo uma população de 515.266 mil habitantes (IBGE - Censo 2000), outros municípios também tem parceria com o PIEJ como Contendas do Sincorá, Barra da Estiva, Rio de Contas, estes pertencentes a 14º DIRES (figura II).



Figura III - Mapa do estado da Brasil, Bahia e região de estudo indicando as cidades de onde os pacientes provieram.

#### 4.2 Pacientes

Os indivíduos que procuraram o CERDEPS-PIEJ foram encaminhados para consulta com equipe multidisciplinar (anexo 2) composta por médico clínico e otorrinolaringologista, enfermeiras e auxiliares de enfermagem. Na consulta foi

realizada a anamnese com o preenchimento de uma ficha clínico-epidemiológica (anexo 3) que contempla os dados pessoais, antecedentes médicos pessoais e familiares, situação epidemiológica, história clínica e o exame físico com seções especiais para as lesões cutâneas e mucosas, uma seção para a compilação dos dados laboratoriais, tratamento com as queixas de efeitos colaterais, e parte referente à evolução dos pacientes. As lesões foram documentadas fotograficamente e realizados exames diagnósticos como a IDRM, IFI, biópsia da lesão e aspirado de linfonodo. Os pacientes com diagnóstico confirmado receberam o tratamento padrão recomendado pelo Ministério da Saúde (Glucantime®, 20mg Sb+5/Kg/dia durante 20 dias). Também foram realizados: hemograma completo, analise bioquímica constando transaminases hepáticas (AST, ALT), fosfatase alcalina, amilase, lípase, uréia e creatinina. Na mesma amostra de sangue periférico foram dosadas as citocinas (IFN-γ, TNF-α e IL-10) tanto plasmáticas como nos sobrenadantes de cultura.

Para a documentação da variável duração da lesão foi questionado o período de tempo em dias transcorrido entre a observação da lesão e a primeira consulta, o tempo de cura foi o tempo em dias transcorrido entre o início do tratamento e cicatrização total da lesão com reepitelização, quando o paciente recebia alta ambulatorial. O tamanho da lesão foi aferido em centímetros pelo maior diâmetro da úlcera primária.

#### 4.3 A amostra de estudo

O presente trabalho foi um estudo observacional, sendo uma coorte prospectiva. Ao final de 24 meses de acompanhamento (dezembro de 1999 – dezembro de 2001), de um total de 289 pacientes, 93 apresentaram os critérios de inclusão necessários e participaram do estudo. 107 pacientes não retornaram após o término da primeira série de medicação, configurando perda de seguimento, pela impossibilidade do acompanhamento da evolução destes pacientes. Após busca ativa semestral todos os pacientes encontrados apresentavam cura clínica com cicatrização e re-epitelização da lesão. Este grupo não apresentou diferenças significativas em relação às médias das variáveis duração da lesão e tamanho da lesão. Estes pacientes foram, portanto, excluídos do estudo. Outros 89 pacientes apresentaram outra forma de apresentação da LTA que não a LCL.

#### 4.4 Critérios de inclusão

Foram cadastrados no estudo os pacientes que tiveram diagnóstico clínico de leishmaniose Tegumentar, confirmado com exame anátomo-patológico com diagnóstico de Leishmaniose tegumentar, ou dermatite granulomatosa crônica e IDRM positiva. Para a amostra do estudo foram selecionados os pacientes que apresentavam lesão típica de LTA classificados, como LCL (MARZOCHI, 1994), e que receberam tratamento

Foram cadastrados no estudo os pacientes que tiveram diagnóstico clínico de leishmaniose Tegumentar, confirmado com exame anátomo-patológico com diagnóstico de Leishmaniose tegumentar, ou dermatite granulomatosa crônica e IDRM positiva. Para a amostra do estudo foram selecionados os pacientes que apresentavam lesão típica de LTA classificados, como LCL (MARZOCHI, 1994), e que receberam tratamento com Glucantime<sup>®</sup> na dose padrão de 20mg sb<sup>+5</sup>/Kg/dia durante 20 dias, tendo concluído todo o tratamento e recebido alta ambulatorial, preenchendo os critérios de cura clínica, com cicatrização e re-epitelização total da lesão. Após a cura clínica, os pacientes receberam alta ambulatorial, e foram orientados a retornar ao serviço médico caso apresentem recidiva da lesão. Na nossa coorte não foi observada recidiva de pacientes após a alta ambulatorial.

#### 4.5 Critérios de exclusão

Diagnóstico prévio de doenças crônico degenerativo como diabetes mellitus, hipertensão ou cardiopatias. Pacientes com passado de LTA, doença de Chagas, tuberculose e hanseníase. Pacientes que ao procurar o ambulatório já haviam começado o tratamento com o Glucantime<sup>®</sup>. Pacientes com outras formas de LTA que não a LCL(MARZOCHI, 1994), ou que apresentassem formas atípicas de ulceração.

# 4.6 Critérios Éticos

Os indivíduos que procuraram o CERDEPS-PIEJ foram informados sobre os objetivos do estudo e estando cientes, os que concordaram em participar, assinaram um termo de consentimento informado (em anexo 4), sendo que os indivíduos que se recusaram à participação continuaram a receber atendimento ambulatorial no mesmo local sem qualquer distinção. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos – UFBA.

#### 4.7 Biópsia e histopatologia

A biópsia foi realizada através da retirada de um fragmento da lesão utilizando se um "punch" diâmetro de 3,5mm (BAKER CUMMINS; Pharmaceuticals, Inc. Miami, FL.) na borda da lesão, após anestesia local com cloridrato de lidocaína, solução a 2% sem vasocontrictor (Astra Química e Farmacêutica Ltda, Tamboré, SP, Brasil). O fragmento foi conservado em formol tamponado a 10%, para a fixação. A biópsia foi incluída em Foi realizado coradas hematoxilina-eosina. parafina seccões por as imunohistoquímica através do método de peroxidase indireta, utilizando um anticorpo policional anti-Leishmania como anticorpo primário. Os laudos anatomopatológicos foram emitidos pelos patologistas do laboratório de Patologia e Biologia Celular do CPQGM - Fiocruz.

### 4.8 Reação de Montenegro

A intradermo-reação de Montenegro é feita de rotina no serviço de referência PIEJ em Jequié, Bahia. A reação é realizada com a injeção de 0,1ml de antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* (MHOMBR86BA-125), contendo 25 μg de proteína/ml, preservado em fenol (REED et al., 1986), produzido no Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Foi considerada positiva a reação com diâmetro igual ou superior a 5mm.

#### 4.9 Re-estimulação in vitro

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas através do método de gradiente de densidade utilizando-se Histopaque (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). As CMSP foram cultivadas na concentração de 3x10<sup>6</sup> células/ml em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY), contendo com penicilina 100U/ml e estreptomicina 100μg/ml e suplementado com L-glutamina 300mg/L (Gibco, Grand Island, NY), e 10% de soro humano AB, em placas de 24 orifícios. As culturas foram mantidas sem estímulo ou estimuladas por 10μg/ml de antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* (MHOMBR86BA-125), por 24, 48 ou 96 horas. Os sobrenadantes colhidos

após 24, 48 ou 96 horas de cultura em estufa 5% CO<sub>2,</sub> 95% de umidade a temperatura de 37°C foram aliquotados a -20°C.

### 4.10 Dosagem de citocinas

As dosagens de citocinas do sobrenadante ou plasma dos pacientes foram realizadas pela técnica de ELISA utilizando—se kits comerciais e seguindo as recomendações do fabricante (PharMingem, San Diego, CA). Nos sobrenadantes de 24 horas de cultura foi dosado o TNF—α, nos de 48 horas foi dosado a IL-10 e nos sobrenadantes de 96 horas foi dosado o IFN-γ.

#### 4.11 Análise estatística

Foi utilizado o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 3.0, (GraphPad software, Inc. San Diego, CA).Como os dados não apresentaram uma distribuição gaussiana após o teste de Kolmogorov-Smirnov, foi utilizado para as correlações o teste de Spearman que é usado para a medição de correlações não paramétricas entre duas variáveis ordinais ou sem distribuição normal, sendo o coeficiente de Spearman (r<sub>s</sub>) uma medida da direção e força de associação entre as duas variáveis. Para a interpretação dos

resultados das correlações inicialmente observamos o valor do  $r_s$  que se = 0 indica que as duas variáveis não são alteradas juntas, ou seja, não existe correlação, se  $0 > r_s > 1$  as variáveis tendem a aumentar ou diminuir juntas, o que significa uma correlação direta, respectivamente, se r = 1,0 ou -1,0 existe uma correlação perfeita, e se  $-1 > r_s > 0$  indica que enquanto uma variável aumenta a outra diminui e vice-versa, o que significa uma correlação inversa. A probabilidade (p) é o valor que responde a questão se realmente existe ou não uma correlação entre as variáveis na população geral. Ou seja, qual é a chance em que numa amostra randômica o coeficiente de correlação irá resultar diferente do observado na amostra inicial. Consideramos como estatisticamente significativo o valor de p < 0,05. Observando os dados relativos ao intervalo de confiança da correlação observamos se existe o efeito de trivialidade biológica quando este é muito prôximo de zero ou se existe importância biológica quando estes valores se aproximam de 1.

As curvas observadas nos gráficos foram elaboradas com a regressão linear simples, utilizando a equação da reta Y=  $\alpha$  +  $\beta$ X, onde Y é o valor da abscissa, X é o valore da ordenada,  $\alpha$  é o intercepto porque é o valor que Y assume quando uma reta intercepta o eixo das ordenadas, ou seja, quando X=0. O valor de  $\beta$  é a tangente trigonométrica do ângulo  $\theta$ , delimitado pela reta de equação e pela reta paralela ao eixo das abscissas que passa pelo ponto  $\alpha$ . As linhas pontilhadas presentes nos gráficos indicam o intervalo de predição de 95%. O intervalo de predição é a área onde é esperado que estejam 95% dos pontos.

# 5.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes

Na amostra estudada houve 66% de pacientes do sexo masculino e 34% feminino e a média de idade foi de 31,3 anos, desvio padrão 18,9, e mediana de 26 anos, com a idade máxima e mínima em 87 a e 5 anos, respectivamente. Foi observado que 50 pacientes (58%) apresentaram, no momento da consulta, adenopatia no linfonodo de drenagem da lesão, e que 42% (36 pacientes) não referiram linfadenomegalia nem apresentavam linfadenomegalia ao exame físico. Sete pacientes não souberam responder se haviam apresentado adenite satélite. Setenta e três porcento dos pacientes apresentaram uma lesão única e 27% apresentaram de duas a quatro úlceras e o local mais frequente de lesão foram os membros inferiores, acometidos em 65% dos pacientes, seguidos pelos membros superiores em 20%, 5% em face e 4% no tronco, 6% dos pacientes apresentaram lesões tanto acima quanto abaixo da cintura. O tamanho da lesão apresentou média de 3,0 cm ± 1,7, sendo a mediana 3,00 cm e o máximo em 10,0 cm e o mínimo em 1,0 cm. A duração da lesão teve média de 56 ± 46 dias, com mediana de 40 dias, e com máximo de 300 e mínimo de 4 dias. A média do tempo de cura foi de 85 ± 53 dias, com mediana de 60 dias e máximo de 320 e mínimo de 30 dias. Quarenta e quatro porcento dos pacientes foram

tratados com apenas uma série do antimonial pentavalente, enquanto que 37% receberam 02 séries e 19% receberam três séries da medicação.

A positividade da reação de Montenegro foi de 77%, e apenas seis pacientes não retornaram para a leitura no período de 72h e foram excluídos da análise da intradermo-reação de Montenegro. Os dados acima estão sumarizados na Tabela 1 e no anexo 5.

**Tabela 1 -** Dados gerais dos 93 pacientes. Números relativos a freqüências, médias e medianas.

	Freqüência	Media ±DP	Mediana	Máximo	Mínimo
Sexo Masculino	64%				
Idade (em anos)		31,3 ± 18,9	26	87	5
Adenopatia	58%				
Lesão única	73%				
02-04 Lesões	27%				
Lesão em MMII	65%				
Lesão em MMSS	20%				
Lesão em Face	5%				
Lesão em Tronco	4%				
Tamanho da lesão (cm)		3,1 ± 1,7	3,00	10,00	1,00
Duração da lesão (dias)		56 ± 46	40	300	4
Tempo de cura (dias)		$85 \pm 53$	60	320	30
Positividade da IDRM	74,5%				
Tratamento com 01 série de Sb <sup>+5</sup>	44%				
Tratamento com 02 séries de Sb <sup>+5</sup>	37%				
Tratamento com 03 séries de Sb <sup>+5</sup>	19%				

## 5.2 Produção de citocinas IFN-γ, TNF-α e IL-10

A média da concentração das citocinas no sobrenadante das CMSP reestimuladas com ASL foi de 1170  $\pm$  1046 pg/ml para o IFN- $\gamma$ , de 285,9  $\pm$  414,9 para o TNF- $\alpha$  e de 6,112  $\pm$  18,13 para a IL-10. As citocinas dosadas diretamente no plasma dos pacientes, também foram dosadas, e apresentaram medianas de 23,27  $\pm$  46,51 para o IFN- $\gamma$ , de 65,67  $\pm$  174,5 para o TNF- $\alpha$  e de 52,23  $\pm$  160,3 para a IL-10 plasmática. Os dados acima estão sumarizados na tabela 2 e no anexo 5.

Tabela 2 - Dados gerais dos 93 pacientes. Números relativos a freqüências, médias e medianas.

	Media ±DP	Mediana	Máximo	Mínimo
TNF-α Sobrenadante	285,9 ± 414,9	107,3	1752	0
IFN-γ Sobrenadante	1770 ± 1046	1725	4026	0
IL-10 Sobrenadante	6,1 ± 18,1	16,50	126,4	0
TNF-α plasmático	65, 7 ± 174,5	0	937,1	0
IFN-α plasmático	23,3 ± 46,5	0	184,1	0
IL-10 plasmático	52,2 ± 160,3	5,4	933,7	0

## 5.2 Análise de correlação entre as variáveis clínicas.

Dentre as variáveis clínicas observou-se que o tamanho da lesão correlaciona-se diretamente com o tempo de cura após o tratamento com o antimonial (p = 0,029, e  $r_s = 0,2539$ ), ou seja, quanto maior a lesão mais lenta é a evolução do paciente para a cura. (gráfico 1)

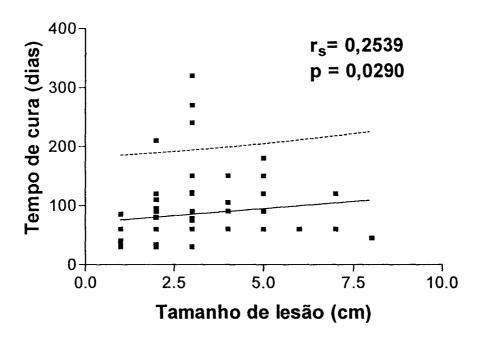


Gráfico 1. Correlação direta entre o tamanho da lesão em cm e o tempo de cura em dias. (A equação da curva observada foi Y=  $70.82 + 4,79X \pm 4,13$ , o intervalo de confiança de 0.02005 a 0.4614, o valor de p = 0,0290 e o coeficiente  $r_s$  = 0,2539).

O tamanho da lesão se correlacionou diretamente com a quantidade de antimonial pentavalente utilizado pelos pacientes, ou seja, quanto maior a lesão, maior a quantidade de antimonial necessária para o paciente atingir a cura, gráfico 2 (p = 0,022,  $e r_s = 0,2554$ ).

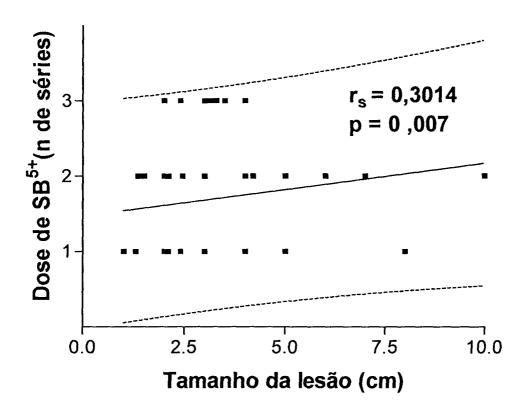


Gráfico 2 - Correlação direta entre o tamanho da lesão e o número de séries de antimonial pentavalente (A equação da curva observada foi Y=  $1.206 + 0.1006X \pm 0.04987$ , o intervalo de confiança de 0.07086 a 0.4885, o valor de p = 0,007, e o coeficiente  $r_s = 0,3014$ ).

Os indivíduos mais velhos também apresentam um maior tamanho de lesão (gráfico 3), havendo uma correlação direta entre a idade e o tamanho da lesão (p = 0.0402 e  $r_s$  = 0.2299).

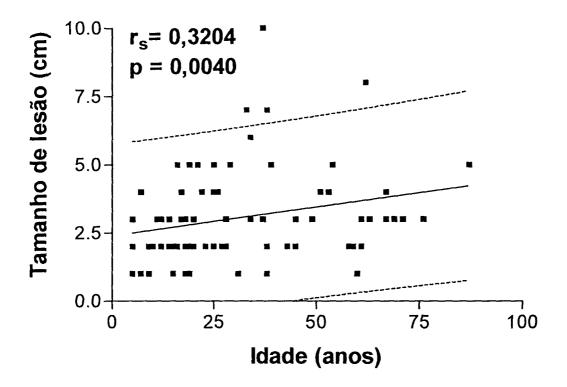


Gráfico 3– Correlação direta entre a idade em anos e o tamanho da lesão em cm (A equação da curva observada foi Y=  $2.402 + 0.02094X \pm 0.009414$ , o intervalo de confiança de 0.1002 a 0.5106, o valor de p = 0,004, e o coeficiente  $r_s$  = 0,3204).

# 5.3 Correlação entre as variáveis clínicas e imunológicas.

A produção do TNF- $\alpha$  (pg/ml) no sobrenadante após a estimulação com antígeno brato de *Leishmania*, se correlacionou diretamente ( p = 0,0274, r<sub>s</sub> = 0,3252) com o tamanho da lesão(cm). (gráfico 4)

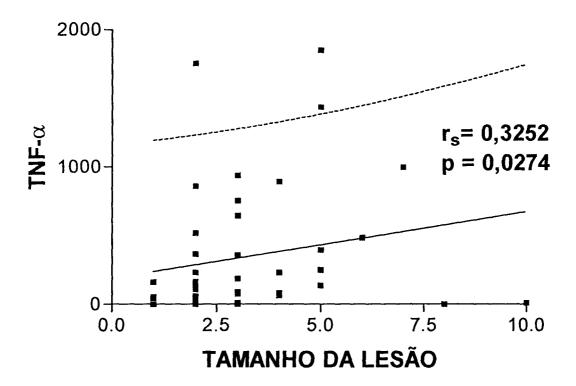


Gráfico 4 – Correlação direta entre a produção de TNF- $\alpha$  em pg/ml das CMSP reestimuladas com antígeno bruto de *Leishmania* e tamanho da lesão. (A equação da curva observada foi Y=192.0 +47.87X  $\pm$  36.93, o intervalo de confiança de 0.02962 a 0.5685, o valor de p = 0,0274, e o coeficiente  $r_s$  = 0,3252).

## 5.4 Correlação entre os dados imunológicos

Existe uma correlação direta entre as concentrações de TNF-α com as de IFN-γ (gráfico 5), e as de IL-10 (gráfico 6), e também entre as concentrações de IFN-γ e IL-10 (gráfico 7) no sobrenadante das células mononucleares re-estimuladas.

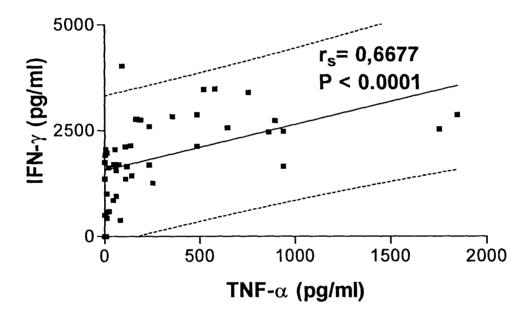


Gráfico 5- Correlação direta entre a produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em pg/ml, das CMSP re-estimuladas com antígeno bruto de *Leishmania* (A equação da curva observada foi Y= 1566 + 1.075X  $\pm$  0.2978, o intervalo de confiança de 0.4514 a 0.8038, o valor de p<0.0001, e o coeficiente  $r_s$  = 0,6677).

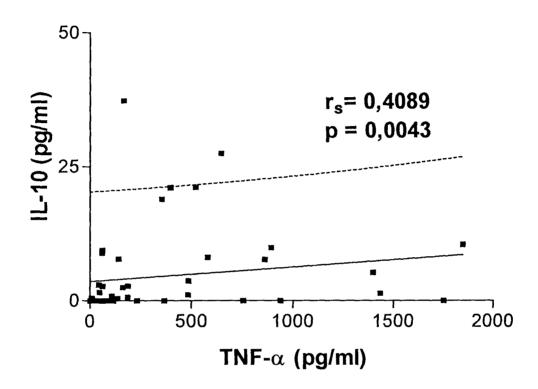


Gráfico 6– Correlação direta entre a produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  em pg/ml, das CMSP re-estimuladas com antígeno bruto de *Leishmania*. (A equação da curva observada foi Y= 3.623 +0.002652X  $\pm$  0.002500, o intervalo de confiança de 0.1293 a 0.6283, o valor de p<0.0043, e o coeficiente  $r_s$  = 0,4089).

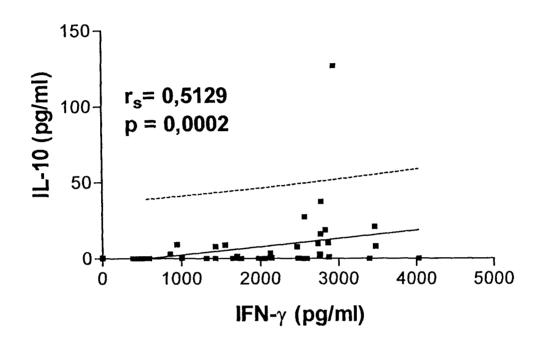


Gráfico 7 — Correlação direta entre a produção de IL-10 e IFN- $\gamma$  em pg/ml, das CMSP re-estimuladas com antígeno bruto de *Leishmania* (A equação da curva observada foi Y= -2.959 + 0.005361X ± 0.002576, o intervalo de confiança de 0.2188 a 0.6810, o valor de p = 0,002, e o coeficiente  $r_s$  = 0,5129).

Também foi observado uma correlação direta entre as concentrações TNF-α plasmáticos e as de IFN-γ e de IL-10 (gráfico 8 e 9).

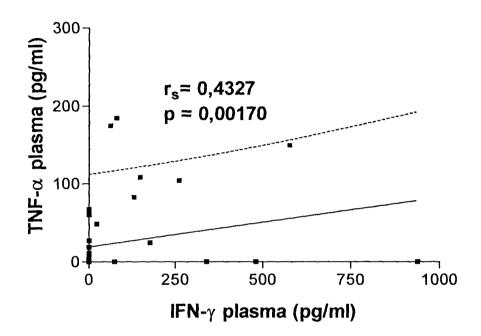


Gráfico 8 - Correlação direta entre os níveis TNF- $\alpha$  plasmático e IFN- $\gamma$  plasmático em pg/ml (A equação da curva observada foi Y= 19.13 + 0.06313X ± 0.03738, o intervalo de confiança de 0.2188 a 0.6810, o valor de p = 0,0017, e o coeficiente  $r_s$  = 0,4327).

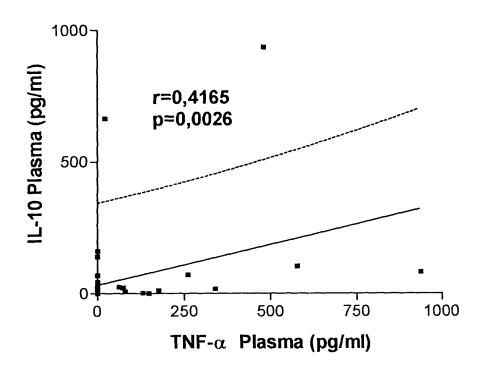


Gráfico 9 - Correlação direta entre os níveis TNF- $\alpha$  plasmático e IL-10 plasmático em pg/ml. (A equação da curva observada foi Y= 32.01+ 0.3079X  $\pm$  0.1249, o intervalo de confiança de 0.1480 a 0.6279, o valor de p = 0,0026, e o coeficiente  $r_s$  = 0,4165).

No presente estudo foram avaliadas à presença de correlações entre variáveis clínicas e imunológicas na LTA, avaliando de que forma os dados clínicos, e os níveis das citocinas podem fornecer elementos preditivos do tempo de cura e da resposta terapêutica. Para isso, usamos como parâmetros clínicos a duração e o tamanho da lesão aferidos na primeira consulta, e a resposta ao tratamento, assim como as concentrações das citocinas IFN-y, TNF-α e IL-10, mensurados diretamente no plasma, e após re-estimulação in vitro das CMSP com ASL. O principal achado do presente estudo foi que o tamanho da lesão se correlaciona diretamente com o tempo de cura e a resposta terapêutica, ou seja, o tamanho de lesão é um parâmetro que na primeira consulta pode auxiliar no prognóstico e número de séries do Sb<sup>+5</sup> necessárias para a cura. A idade do paciente e os níveis de TNF-α no sobrenadante correlacionam-se diretamente com o tamanho da lesão. Os níveis de TNF- $\alpha$  estão diretamente correlacionados com os níveis de IL-10 e IFN-y no sobrenadante. A produção destas citocinas pode estar inter-relacionada na resposta anti-Leishmania e estas devem influenciar indiretamente o tamanho da lesão e, portanto, influenciando o tempo de cura e resposta terapêutica.

Embora a amostra tenha um grande número de indivíduos, foi observado que as variáveis estudadas não apresentavam distribuição normal ou simétrica, não sendo, portanto apropriada à utilização do teste de correlação de Pearson. O teste mais adequado à amostra foi o teste de Spearman, mesmo sendo menos robusto e com

menor probabilidade de rejeitar a hipótese da nulidade, quando está é falsa. Este teste nos permite avaliar a associação ou dependência entre duas variáveis não paramétricas, o coeficiente "rs" indica o grau de associação. Quando são utilizados testes paramétricos podemos utilizar o artificio do r<sup>2</sup> que indica quanto da modificação de uma variável pode ser explicada pela modificação na outra, não sendo esta forma de expressão dos resultados apropriada para o teste de Spearman. Neste teste devemos observar a aproximação do "rs" de 1, sendo que quanto mais próximo de um, maior associação entre as variáveis. Podemos observar nos resultados que as correlações encontradas, principalmente entre as variáveis clínicas, são de baixo grau de associação, o que já era esperado, pois como diversos fatores devem influenciar o tempo de cura, e a resposta ao tratamento. Provavelmente, uma variável apenas não deve exercer grande influência sobre a outra, ou ser um agente causal, portanto, tratase de um processo multifatorial. Se observássemos o fenômeno de apenas um parâmetro ser o responsável pela modificação do tempo de cura ou resposta terapêutica, provavelmente, seria devido à co-linearidade onde, ambas sofreriam a influência dos mesmos fatores, não sendo variáveis indeependentes e, portanto não estaríamos mensurando a associação entre as duas variáveis. Acreditamos que o ideal é uma análise multivariada dos dados, ou seja, estudar a relação entre os diversos parâmetros, e o tempo de cura e a resposta terapêutica simultaneamente. Entretanto, estes testes multivariados necessitam de amostras com distribuição normal e amostras com maior número de indivíduos. Nesta primeira análise podemos definir os principais parâmetros que devem ser seguidos na continuação da coorte.

As medianas da duração da lesão (40 dias), tamanho da lesão (3,0cm), e tempo de cura (60 dias) da presente série são concordantes com outras séries já publicadas

(MAGALHÃES, 1982; LLANOS-CUENTAS, 1984; ROMERO et al., 2001). No nosso estudo, em 44% dos pacientes foi necessário utilizarmos apenas uma série do Sb<sup>+5</sup>, e em 37% dos pacientes duas séries para a cura. Na literatura, estudos comparando a eficácia do com Sb<sup>+5</sup> com outras drogas em áreas com predominância de *L. braziliensis*, mostram taxas variáveis de cura com o uso de uma série (entre 62% (SALDANHA, 1997) e 42,8% (COSTA, 1986)). Diferenças entre os estudos são possíveis já que distintas cepas de *Leishmania* podem ter diferentes graus de susceptibilidade ao Sb<sup>+5</sup> *in vitro* (MOREIRA & PETRILLO-PEIXOTO, 1991). Outros fatores que podem influir na resposta terapêutica é a não padronização da dose, da via de administração, além de diferenças na metodologia o que dificulta a comparação da eficácia do tratamento entre os diversos estudos (OLIVEIRA-NETO et al., 1997; OLIVEIRA-NETO et al., 1997; SAMPAIO et al., 1997; ROMERO et al., 2001).

Existem registros de positividade da IDRM entre 48% e 97% (MAYRINK et al., 1979; CUBA CUBA et al., 1980) em pacientes provenientes de áreas nas quais há predominância de *L. braziliensis*. Na nossa série, encontramos 74,5% de indivíduos positivos. A existência de 25,5% resultados falso negativos na IDRM em casos confirmados pela visualização do parasito na biopsia, poderia dever-se a pacientes em fases iniciais da infecção (PESSOA, 1948), entretanto, no nosso estudo não encontramos uma diferença significativa entre os indivíduos avaliando a duração da lesão e a positividade da IDRM. Há a possibilidade de erros na leitura do teste ou na aplicação do antígeno pelos profissionais de saúde, embora, não possamos descartar que alguns indivíduos, mesmo com a lesão típica, não apresentem resposta de hipersensibilidade tardia ao antígeno de Montenegro. Apesar da demonstração da alta sensibilidade e especificidade encontrada por outros autores (MARTINS NETTO, 1990),

acreditamos que ainda persiste por ser elucidado o papel da IDRM como critério diagnóstico.

Os valores das medianas encontrados na nossa série para as citocinas são IFN-γ (1770 pg/ml), TNF-α (285,9pg/ml) e IL-10 (6,11 pg/ml) no sobrenadante, quanto as citocinas IFN-γ (23,27 pg/ml), TNF-α (65,67 pg/ml) e IL-10 (52.23 pg/ml) dosados diretamente do plasma. Há grande variação na literatura quanto aos níveis das citocinas (IFN-γ, TNF-α e IL-10) encontrados em pacientes com LTA (BARRAL-NETTO et al., 1991; CASTES et al., 1993; MORSY et al., 1994; DA-CRUZ et al., 1996; WEINSTOCK et al., 1997; BARRAL-NETTO et al., 1998; COUTINHO et al., 1998; RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998). Tal fato pode dever-se à diferença entre os protocolos ou "kits" comerciais para a mensuração das citocinas entre os diferentes laboratórios, à utilização de diferentes estímulos na re-estimulação das CMSP dos pacientes ou a diferenças regionais relacionadas ao parasita ou a fatores genéticos dos indivíduos. Também não podemos descartar diferenças na amostragem entre os diversos estudos, e na obtenção e armazenamento das amostras.

O tamanho de lesão foi correlacionado diretamente com o tempo de cura, indicando que quanto maior a lesão na primeira consulta maior o tempo até a sua completa cicatrização e reepitelização. Esta associação já havia sido demonstrada quando os pacientes foram divididos em dois grupos utilizando-se como critério a área da lesão menor ou maior igual a 4.0 cm (LLANOS-CUENTAS, 1984). O tamanho da lesão na primeira consulta também se correlaciona diretamente com número de séries de Sb<sup>+5</sup> necessárias para a cura do paciente. Estes dados podem indicar que, com a melhoria do acesso à saúde e com diagnóstico precoce podemos reduzir o tempo de

restabelecimento do paciente. Todavia, já foi demonstrado que o tratamento precoce, antes mesmo do aparecimento da úlcera, previne o surgimento ou o aumento do tamanho da lesão em apenas 50% dos casos (MACHADO et al., 2002). Provavelmente existe uma dissociação entre a cura clínica, ou seja, a cicatrização e reepitelização da lesão, e a cura parasitositológica relacionada à redução da carga parasitaria, pois o tratamento precoce não previne a úlcera em 50% dos pacientes e existem evidências da persistência do parasito na cicatriz até onze anos após o tratamento e a cura clínica, estando a Leishmania viável e silenciosa, sem causar lesão aos pacientes (SCHUBACH et al., 1998). Portanto, elementos relacionados não somente ao parasita e ao tratamento, mas fenômenos desencadeados nos momentos iniciais da infecção, como a intensidade da resposta anti-Leishmania, participam no estabelecimento do tamanho da lesão e do tempo de cura. Assim sendo, acreditamos que na primeira consulta o tamanho da lesão deve ser utilizado como um indicativo do tempo de cicatrização com a utilização do tratamento padrão e da intensidade da reação anti-Leishmania, mas não da duração da lesão.

Nós observamos uma correlação direta entre a idade dos pacientes e o tamanho da lesão na primeira consulta. Possivelmente este fato não se deve exclusivamente à idade, mas provavelmente às co-morbidades tanto sistêmicas (fatores endócrinos, hematológicos e nutricionais) quanto locais associadas a distúrbios vasculares ou neurológicos (BENNETT et al., 1981; THORNE, 1981; CARTER & BALIN, 1983; BERLINER, 1986; VAN DE KERKHOF et al., 1994). Estas diferenças não parecem se deverem à maior dificuldade ou demora na procura de assistência médica, pois não houve diferença entre a idade e a duração da lesão.

Observamos também uma correlação direta entre o tamanho da lesão e os níveis do TNF-α produzidos após re-estimulação in vitro. Tal correlação pode indicar a associação desta citocina com a gravidade das lesões na leishmaniose, como é evidenciada pela maior expressão desta citocina nos pacientes com a LM, sua associação com a cronicidade das lesões (CASTES et al., 1993; MELBY et al., 1994; DA-CRUZ et al., 1996), bem como a resposta terapêutica quando é utilizado um inibidor de TNF-α associado ao antimonial pentavalente (LESSA et al., 2001). O estudo de polimorfismo dos genes de TNF em diversas doenças infecciosas, principalmente tegumentar e leishmaniose visceral, tem evidenciado malária. leishmaniose associações de determinados alelos com gravidade, risco de doença aumentado e maiores níveis de TNF-α (MCGUIRE et al., 1994; CABRERA et al., 1995; KARPLUS et al., 2002). Níveis de TNF-α elevados podem participar na patogênese da úlcera leishmaniótica, aumentando a expressão e ativação de proteases, alterando a produção de EGF e PDGF (TRENGOVE et al., 2000), inibindo mecanismos anticoagulantes e promovendo o processo de trombose, portanto dificultando a cicatrização.

Os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 após a re-estimulação das CMSP com ASL correlacionam-se diretamente. Já no plasma encontramos a associação apenas entre e os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 e TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . A correlação direta entre as citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  pode dever-se à estimulação das células macrofágicas pelo IFN- $\gamma$ , levando a estimulação da produção do TNF- $\alpha$  pelo aumento da transcrição e estabilidade do RNAm associado a maior expressão do promotor NF- $\kappa$ B (HAYES et al., 1995). O TNF- $\alpha$  também pode atuar com papel semelhante induzindo a expressão de IL-10 em CMSP humanos, através da indução da transcrição do RNAm e aumentando a estabilidade

deste (WANIDWORANUN & STROBER, 1993). Assim, justificando o aumento destas três citocinas simultaneamente.

A IL-10, em camundongos tem um papel Th2 bem definido apresentando uma ação na redução da expressão do CPH classe II em células dendríticas, monócitos e células de Langerhans (DE WAAL MALEFYT et al., 1991; BEJARANO et al., 1992; CAUX et al., 1994; PEGUET-NAVARRO et al., 1994), além da redução da expressão das moléculas coestimulatorias ICAM I, CD80 e CD86 (KUBIN et al., 1994; WILLEMS et al., 1994) culminando na inibição da produção de IFN-γ e TNF-α e outras citocinas próinflamatórias. Todavia, no homem ainda não foi demonstrada uma clara ação de modulação negativa da IL-10 sobre a resposta inflamatória (YSSEL et al., 1992; QUAYLE et al., 1993; SIMON et al., 1993). No homem, a IL-10 parece ser extremamente pleiotrópica e multifuncional, não ocorrendo à polarização Th1 ou Th2 observada nos murinos.

Um dos motivos que pode explicar a presença de TNF-α, IFN-γ e IL-10 correlacionadas diretamente é que componentes do antígeno de *Leishmania* estejam estimulando a sua produção conjuntamente. É possível que o antígeno leve à produção de IL-12 e que esta citocina induza a produção de outras citocinas. Tal efeito já foi demonstrado em outro sistema (WINDHAGEN et al., 1996), onde, após estimulação, as CMSP produzem níveis elevados de IL-12, o que induz a produção de IL-10, TNF-α e IFN-γ simultaneamente. Contudo, nós não avaliamos a produção de IL-12, e não há dados da literatura que corroborem com uma elevada produção de IL-12, no plasma ou em CMSP após estimulo com antígeno de *Leishmania*. Acreditamos também, que pode estar ocorrendo uma produção de IFN-γ e TNF-α em resposta a infecção pela

Leishmania braziliensis e a estimulação da produção de IL-10 como um mecanismo regulatório, como forma de modular negativamente a produção destas outras duas citocinas, reduzindo a reação de hipersensibilidade na lesão.

Tem sido especulado que a resposta imune humana anti-Leishmania mais eficaz para o hospedeiro seria aquela desenvolvida pelos indivíduos classificados como subclínicos. Neles existe uma positivação da IDRM sem aparecimento da lesão, possivelmente decorrente da infecção sem evolução para a doença. Estes indivíduos, quando comparados na produção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , após estimulação com ASL, apresentaram menores níveis destas citocinas do que os pacientes com LCL da mesma área endêmica (FOLLADOR et al., 2002). Não foi observada maior produção de outras citocinas como a IL-5 ou a IL-10 nos indivíduos subclínicos. Deste modo, não apenas a presença das citocinas que participam da resposta anti-Leishmania, mas a intensidade da reação também pode ser uma das responsáveis pelo estabelecimento da lesão cutânea. Por exemplo, na forma mucosa há uma reação de hipersensibilidade intensa com elevada produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e a presença de raros parasitas na lesão (BITTENCOURT & BARRAL, 1991), mostrando uma dissociação entre a intensidade da reação e a intensidade do parasitismo culminando com destruição tecidual intensa da lesão.

Na nossa amostra, onde todos os pacientes responderam ao tratamento, os dados referentes as citocinas TNF-α IFN-γ e IL-10 podem indicar que esta seja a resposta anti-*Leishmania* mais favorável para o hospedeiro, uma vez que a lesão cutânea esteja estabelecida. Nos pacientes que têm a forma mucosa, há exacerbação da produção de TNF-α e IFN-γ associada a níveis baixos de IL-10 (BACELLAR et al.,

2002) e existe uma ação deletéria da resposta imune, com destruição tecidual e prognóstico desfavorável com o tratamento padrão. Nos pacientes com LCD, IL-10 é encontrada em altos níveis, juntamente com níveis reduzidos de TNF-α e IFN-γ e também há uma resposta anti-*Leishmania* deficiente, sem contenção dos parasitas, permitindo a multiplicação e disseminação dos mesmos. Portanto, acreditamos que, como observado no presente estudo, a correlação direta entre as três citocinas, ou seja a produção concomitante das citocinas com atividade de exacerbação, como o IFN-γ e o TNF-α, e modulação negativa da resposta inflamatória, como a IL-10, deve ser importante para a manutenção de uma resposta imune anti-*Leishmania* com o equilíbrio entre a destruição do parasito, lesão tecidual e prognóstico favorável para a cicatrização da lesão.

Não foi encontrada correlação entre os níveis plasmáticos das citocinas IFN-γ, IL-10 e TNF-α e aqueles obtidos *in vitro* após re-estimulação com ASL. As citocinas dosadas no plasma podem não ser o resultado da resposta periférica anti-*Leishmania*. Outras co-morbidades como parasitoses, doenças virais e até mesmo a presença de infecções secundárias na lesão leishmaniótica podem ser responsáveis pela produção destas citocinas e apenas uma parcela da sua produção pode estar relacionada com a resposta anti-*Leishmania*, diferentemente da produzida após a re-estimulação com ASL. Portanto, na nossa série não observamos vantagem da dosagem diretamente no plasma sobre a re-estimulação *in vitro* na caracterização da resposta *anti-Leishmania*.

Na nossa série não observamos correlação entre os dados clínicos ou imunológicos e a duração da lesão. Já havia sido demonstrado na literatura a relação entre a duração da lesão, menor que 01 mês e maior ou igual a seis meses, e o

tamanho da lesão (LLANOS-CUENTAS, 1984). Acreditamos que esta associação não foi observada na nossa série porque, com a melhoria de acesso ao sistema de saúde na região, o tempo médio da duração da lesão tem sido reduzido e é raro encontrarmos pacientes com duração da lesão acima de seis meses. Por exemplo, na nossa amostra houve apenas um paciente com duração da lesão superior a 180 dias.

No presente estudo, evidenciamos que o tamanho da lesão na primeira consulta pode ser utilizado como um parâmetro do tempo para a cura da lesão e do número de séries de Sp<sup>+5</sup> em pacientes submetidos ao tratamento padrão. Observamos que a idade e a produção do TNF- $\alpha$  são as principais variáveis que podem influenciar o tamanho da lesão, não apresentando relação com a duração da lesão. O TNF-α pode ser influenciado pela produção de IFN-γ e IL-10, que participam da resposta anti-Leishmania. Acreditamos que o estudo pode contribuir auxiliando os profissionais de saúde ao indicar parâmetros que podem ser avaliados como possíveis indicadores de prognóstico. Será necessário continuar o acompanhamento da coorte na área endêmica com maior número de pacientes, para permitir aplicação de testes estatísticos paramétricos com análises multivariadas, ou seja, avaliando a relação entre diversos fatores simultaneamente. Isto permitirá analisar, mais precisamente, as variáveis relacionadas do processo de cura. Será também necessário ampliar o estudo para outros fatores imunológicos como a produção de IL-12 e avaliação das subpopulações celulares, na busca de novos marcadores que, em conjunto com os existentes, possa permitir maior precisão na predição do prognóstico.

# 7 Conclusão

O tamanho da lesão se correlaciona diretamente com o tempo de cura e número de séries de Sb<sup>+5</sup> sendo o principal parâmetro do prognóstico clínico do paciente. A idade e a produção da citocina TNF-α correlacionam-se diretamente com o tamanho da lesão, ou seja, quanto maior a idade e a produção de TNF-α maior o tamanho da lesão. As citocinas TNF-α e IFN-γ e IL-10, produzidas após a re-estimulação das CMSP com ASL, correlacionam-se diretamente entre si e a produção da citocina TNF-α mensurada no plasma correlaciona-se diretamente com os níveis de IFN-γ e IL-10 dosados no plasma.

- AJDARY S., ALIMOHAMMADIAN M. H., ESLAMI M. B., KEMP K., KHARAZMI A. Comparison of the immune profile of nonhealing Cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. Infect. Immun., 68:1760-4, 2000
- AZULAY R. D. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar. Dermatol. Iber. Latin. Amer., 2:7-15, 1960
- BACELLAR O., LESSA H., SCHRIEFER A., MACHADO P., RIBEIRO DE JESUS A.,
  DUTRA W. O., GOLLOB K. J., CARVALHO E. M. Up-regulation of Th1-type
  responses in Mucosal Leishmaniasis patients. Infect. Immun., 70:6734-40, 2002
- BAGCHI A. K., TIWARI S., GUPTA S., KATIYAR J. C. The latex agglutination test: Standardization and comparison with direct agglutination and DOT-ELISA in the diagnosis of Visceral Leishmaniasis in India. Ann. Trop. Med. Parasitol., 92:159-63, 1998
- BARRAL A., BARRAL-NETTO M., ALMEIDA R., DE JESUS A. R., GRIMALDI JUNIOR G., NETTO E. M., SANTOS I., BACELLAR O., CARVALHO E. M. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection.

  Am. J. Trop. Med. Hyg., 47:587-92, 1992

- BARRAL A., COSTA J. M., BITTENCOURT A. L., BARRAL-NETTO M., CARVALHO E.

  M. Polar and subpolar Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Brazil: Clinical and immunopathologic aspects. Int. J. Dermatol., 34:474-9, 1995
- BARRAL A., GUERREIRO J., BOMFIM G., CORREIA D., BARRAL-NETTO M., CARVALHO E. M. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg., 53**:256-9, 1995
- BARRAL A., PEDRAL-SAMPAIO D., GRIMALDI JUNIOR G., MOMEN H., MCMAHON-PRATT D., RIBEIRO DE JESUS A., ALMEIDA R., BADARO R., BARRAL-NETTO M., CARVALHO E. M., ET AL. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that Leishmania amazonensis produces a wide spectrum of clinical disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 44:536-46, 1991
- BARRAL A., TEIXEIRA M., REIS P., VINHAS V., COSTA J., LESSA H., BITTENCOURT A. L., REED S., CARVALHO E. M., BARRAL-NETTO M. Transforming growth factor-beta in human Cutaneous Leishmaniasis. Am. J. Pathol., 147:947-54, 1995
- BARRAL-NETTO M., BADARO R., BARRAL A., ALMEIDA R. P., SANTOS S. B.,
  BADARO F., PEDRAL-SAMPAIO D., CARVALHO E. M., FALCOFF E., FALCOFF
  R. Tumor necrosis factor (cachectin) in human Visceral Leishmaniasis. J. Infect.
  Dis., 163:853-7, 1991

- BARRAL-NETTO M., BRODSKYN C., CARVALHO E. M., BARRAL A. Human\_Leishmaniasis/cytokines.Bahia.Br. Braz. J. Med. Biol. Res., 31:149-55, 1998
- BARROS M. L. B., PAES, M.G., TALHARI, S. Leishmaniose Cutâneo-Mucosa na Amazônia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **57**:153-4, 1982
- BEJARANO M. T., DE WAAL MALEFYT R., ABRAMS J. S., BIGLER M., BACCHETTA R., DE VRIES J. E., RONCAROLO M. G. Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic t cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. Int. Immunol., 4:1389-97, 1992
- BENNETT L., KAVNER D., LEE B. Y., TRAINOR F. S., LEWIS J. M. Skin blood flow in seated geriatric patients. Arch. Phys. Med. Rehabil., 62:392-8, 1981
- BERLINER H. Aging skin. Part two. Am. J. Nurs., 86:1259-61, 1986
- BITTENCOURT A. L., ANDRADE, Z. A. Aspectos imunopatológicos na Leishmaniose Cutâneo-Mucosa. Hospital (Rio de J.), 71:975-83, 1967
- BITTENCOURT A. L., BARRAL A. Evaluation of the histopathological classifications of American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo**Cruz, 86:51-6, 1991

- BOMFIM G., NASCIMENTO C., COSTA J., CARVALHO E. M., BARRAL-NETTO M.,

  BARRAL A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in

  Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. Exp. Parasitol., 84:188-94, 1996
- BOURREAU E., PREVOT G., GARDON J., PRADINAUD R., LAUNOIS P. High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in Localized Cutaneous Leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. **J. Infect. Dls.,** 184:1628-30, 2001
- BRODSKYN C. I., BARRAL A., BOAVENTURA V., CARVALHO E., BARRAL-NETTO M.

  Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from Mucosal Leishmaniasis. J. Immunol., 159:4467-73, 1997
- BUSS G. Die amerikanische hautleismaniose. Arch. f. Dermatol. u. Syphil., 158:223-65, 1929
- CABRERA M., SHAW M. A., SHARPLES C., WILLIAMS H., CASTES M., CONVIT J., BLACKWELL J. M. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with Mucocutaneous Leishmaniasis. J. Exp. Med., 182:1259-64, 1995
- CACERES-DITTMAR G., TAPIA F. J., SANCHEZ M. A., YAMAMURA M., UYEMURA K., MODLIN R. L., BLOOM B. R., CONVIT J. Determination of the cytokine profile in American Cutaneous Leishmaniasis using the polymerase chain reaction. Clin. Exp. Immunol., 91:500-5, 1993

- CARINI P. U. Identification de "l' ulcera de Bauru" avec le bouton d' Orient. Bull. Soc. Pathol. Exot., 2:255-57, 1909
- CARTER D. M., BALIN A. K. Dermatological aspects of aging. Med. Clin. North. Am., 67:531-43, 1983
- CARVALHO E. M., JOHNSON W. D., BARRETO E., MARSDEN P. D., COSTA J. L., REED S., ROCHA H. Cell mediated immunity in American Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis. J. Immunol., 135:4144-8, 1985
- CASTES M., AGNELLI A., VERDE O., RONDON A. J. Characterization of the cellular immune response in American Cutaneous Leishmaniasis. Clin. Immunol. Immunopathol., 27:176-86, 1983
- CASTES M., CABRERA M., TRUJILLO D., CONVIT J. T-cell subpopulations, expression of interleukin-2 receptor, and production of interleukin-2 and gamma interferon in human American Cutaneous Leishmaniasis. J. Clin. Microbiol., 26:1207-13, 1988
- CASTES M., TRUJILLO D., ROJAS M. E., FERNANDEZ C. T., ARAYA L., CABRERA M., BLACKWELL J., CONVIT J. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **Biol. Res., 26**:233-8, 1993

- CAUX C., MASSACRIER C., VANBERVLIET B., BARTHELEMY C., LIU Y. J., BANCHEREAU J. Interleukin 10 inhibits t cell alloreaction induced by human dendritic cells. Int. Immunol., 6:1177-85, 1994
- CENEPi. Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana, ed 5ª edição (revisada). Brasília/DF: Fundação Nacional de Saúde Ministério da Saúde, 2000
- CONVIT J., PINARDI M. E., RONDON A. J. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. **Trans. R. Soc. Trop. Med.**Hvg., 66:603-10, 1972
- COSTA J. M., NETTO E. M., MARSDEN P. D. Acute airway obstruction due to oedema of the larynx following antimony therapy in Mucosal Leishmaniasis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 19:109, 1986
- COSTA J. M., TADA M. S., NETTO E. M., VALE K. C., LAGO E. L., MARSDEN P. D. [origin of patients carrying American Tegumentary Leishmaniasis in the endemic areas of Tres Bracos and Corte de Piedra-state of Bahia-Brazil]. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 21:145-9, 1988
- COSTA J. M. L. Estudo clínico epidemiológico de um surto epidêmico de Leishmaniose Tegumentar Americana em Corte de Pedra - BA. 1986. Tese de mestrado Universidade de Brasília, Brasília, Brasíl.

- COUTINHO S. G., DA-CRUZ A. M., BERTHO A. L., SANTIAGO M. A., DE-LUCA P. Immunologic patterns associated with cure in human American Cutaneous Leishmaniasis. Braz. J. Med. Biol. Res., 31:139-42, 1998
- CUBA C. C., MARSDEN P. D., BARRETO A. C., ROITMAN I., VEXENAT A., DE LIMA
  L., DE SÁ M. H. Identification of human stocks of *leishmania spp* isolated from
  patients with Mucocutaneous Leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil. **Trans.**R. Soc. Trop. Med. Hyg., 78:708-10, 1984
- CUBA CUBA C. A., MARSDEN P. D., BARRETO A. C., ROCHA R., SAMPAIO R. R.,

  PATZLAFF L. parasitologic and immunologic diagnosis of American Cutaneous

  Leishmaniasis. Bol. Oficina Sanit. Panam., 89:195-208, 1980
- DA-CRUZ A. M., DE OLIVEIRA M. P., DE LUCA P. M., MENDONCA S. C., COUTINHO S. G. Tumor necrosis factor-alpha in Human American Tegumentary Leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 91:225-9, 1996
- DE WAAL MALEFYT R., HAANEN J., SPITS H., RONCAROLO M. G., TE VELDE A., FIGDOR C., JOHNSON K., KASTELEIN R., YSSEL H., DE VRIES J. E. Interleukin 10 (il-10) and viral il-10 strongly reduce antigen-specific human t cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. J. Exp. Med., 174:915-24, 1991

- FOLLADOR I., ARAUJO C., BACELLAR O., ARAUJO C. B., CARVALHO L. P., ALMEIDA R. P., CARVALHO E. M. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. Clin. Infect. Dis., 34:E54-8, 2002
- FOLLADOR I., ARAUJO C., CARDOSO M. A., TAVARES-NETO J., BARRAL A., MIRANDA J. C., BITTENCOURT A., CARVALHO E. M. Outbreak of American Cutaneous Leishmaniasis in Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 32:497-503, 1999
- GARCIA-MISS M. R., ANDRADE-NARVAEZ F. J., ESQUIVEL-VINAS R. E., SIMMONDS-DIAZ E. B., CANTO-LARA S. B., CRUZ-RUIZ A. L. Localized Cutaneous Leishmaniasis (Chiclero's Ulcer) in Mexico: Sensitivity and specificity of ELISA for IgG antibodies to Leishmania mexicana mexicana. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 84:356-8, 1990
- HAYES M. P., FREEMAN S. L., DONNELLY R. P. IFN-gamma priming of monocytes enhances LPS-induced TNF production by augmenting both transcription and mRNA stability. Cytokine, 7:427-35, 1995
- J. C., MITCHELL A. A., PUGH E. W., BRAZ R. F., BEZERRA F. L., WILSON M. E. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. Infect. Immun., 70:6919-25, 2002

- KOFF A. B., ROSEN T. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. J. Am. Acad. Dermatol., 31:693-708; quiz 08-10, 1994
- KUBIN M., KAMOUN M., TRINCHIERI G. Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. J. Exp. Med., 180:211-22, 1994
- LESSA H. A., MACHADO P., LIMA F., CRUZ A. A., BACELLAR O., GUERREIRO J., CARVALHO E. M. Successful treatment of refractory Mucosal Leishmaniasis with Pentoxifylline plus Antimony. Am. J. Trop. Med. Hyg., 65:87-9, 2001
- LINDENBERG A. L' Ulcére de Bauru ou Le Bouton d' Orient au Brésil. Bull. Soc. Pathol. Exot., 2:252-54, 1909
- LLANOS-CUENTAS E. A., MARSDEN P. D., CUBA C. C., BARRETO A. C., CAMPOS

  M. Possible risk factors in development of Mucosal Lesions in Leishmaniasis.

  Lancet, 2:295, 1984
- LLANOS-CUENTAS E. A., MARSDEN, P.D., LAGO, L., BARRETO, A.C., CUBA, C.C., JOHNSON, W.D. Human Cutaneous Leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazilan area of *Leishmania braziliensis* transmission. li. Cutaneous disease. Presentation and evolution. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 17:169-77, 1984

- MACHADO P., ARAUJO C., DA SILVA A. T., ALMEIDA R. P., D'OLIVEIRA JR A., BITTENCOURT A., CARVALHO E. M. Failure of early treatment of Cutaneous Leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. Clin. Infect. Dis., 34:E69-73, 2002
- MAGALHÃES A. V., CHIARINI, L. H., RAICK, A. N. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 24:268-76, 1982
- MAGALHÃES A. V., CHIARINI, L. H.,BARROS, M.L.B., PAES, M.G., DOURADO,H.,SAMPAIO, R.N.R., ROCHA, R.A.A., MARSDEN, P.D., RAICK, A. N. Aspectos clínicos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar na região Amazônica E Centro-Oeste. Revista Goiana de Medicina, 28:143-50, 1982
- MAGALHÃES A. V., MORAES, M. A. P., RAICK, A. N., LLANOS-CUENTAS, A., COSTA, J. M. L., CUBA, C. C., MARSDEN, P. D. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar por *Lesihmania braziliensis braziliensis*. 2. Resposta humoral tissular. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 28:293-99, 1986
- MARROQUIM F., BIAGI, F. Estudio de 19 biopsias de Leishmaniasis Tegumentaria de Mexico. Rev. latinoamer. Anat. pat., 1:145-50, 1957
- MARSDEN P. D. Mucosal Leishmaniasis ("espundia" escomel, 1911). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 80:859-76, 1986

- MARTINS NETTO E. Avaliação de procedimentos imunodiagnósticos numa área endêmica de Leishmaniose Tegumentar na Bahia. 1990.Dissertação de mestrado Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia -Brasil.
- MARZOCHI M. C. A., MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and Visceral Leishmaniases in Brazil emerging anthropozoonosis and possibilities for their control. Cad. Saúde Públ., Rio de Janeiro, 10:359-75, 1994
- P. A., DA COSTA C. A., FALCAO A. R., MELO M. N., FALCAO A. L. Epidemiology of Dermal Leishmaniasis in the Rio Doce Valley, state of Minas Gerais, Brazil. Ann. Trop. Med. Parasitol., 73:123-37, 1979
- MCGUIRE W., HILL A. V., ALLSOPP C. E., GREENWOOD B. M., KWIATKOWSKI D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral Malaria. Nature, 371:508-10, 1994
- MELBY P. C., ANDRADE-NARVAEZ F. J., DARNELL B. J., VALENCIA-PACHECO G., TRYON V. V., PALOMO-CETINA A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of Human Cutaneous Leishmaniasis. Infect. Immun., 62:837-42, 1994
- MONTENEGRO J. Cutaneous reaction in Leishmaniasis. Arch. of Dermatol. and Syphilol., 13:187, 1926

- MONTENEGRO J. Cutis-reação na Leishmaniose. **Anais da faculdade de medicina** de São Paulo, 1:323-30, 1926
- MONTENEGRO J. B. F. Anátomo-patologia da Leishmaniose Cutânea: Úlcera de Bauru. An. Paul. Med. Cirurg., 15:5-11, 1924
- MOREIRA E. S., PETRILLO-PEIXOTO M. L. In vitro activity of Meglumine Antimoniate, a Pentavalent Antimonial drug, on Leishmania promastigotes. **Braz. J. Med. Biol.**Res., 24:459-69, 1991
- MORSY T. A., EL MISSIRY A. G., SARWAT M. A., EL RASSED M. M., HABIB F. S., ABOU GAMRA M. M. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. J. Egypt. Soc. Parasitol., 24:519-42, 1994
- MURRAY H. W., RUBIN B. Y., ROTHERMEL C. D. Killing of intracellular *leishmania* donovani by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. **J. Clin. Invest., 72**:1506-10, 1983
- NATHAN C. F., MURRAY H. W., WIEBE M. E., RUBIN B. Y. Identification of interferongamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. J. Exp. Med., 158:670-89, 1983

- OLIVEIRA-NETO M. P., SCHUBACH A., MATTOS M., DA COSTA S. C., PIRMEZ C. Intralesional therapy of American Cutaneous Leishmaniasis with Pentavalent Antimony in Rio De Janeiro, Brazil--an area of Leishmania (v.) braziliensis transmission. Int. J. Dermatol., 36:463-8, 1997
- OLIVEIRA-NETO M. P., SCHUBACH A., MATTOS M., GONCALVES-COSTA S. C., 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., 57:651-5, 1997
- OLIVEIRA-NETO M. P., SCHUBACH A., MATTOS M., GONCALVES-COSTA S. C., PIRMEZ C. Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis: A comparison between low dosage (5 mg/kg/day) and high dosage (20 mg/kg/day) Antimony regimens. Pathol. Biol. (Paris), 45:496-9, 1997
- PEGUET-NAVARRO J., MOULON C., CAUX C., DALBIEZ-GAUTHIER C., BANCHEREAU J., SCHMITT D. Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to Human Epidermal Langerhans cells. **Eur. J. Immunol., 24**:884-91, 1994
- PELLEGRINO J., PEREIRA L. H., FURTADO T. A. MUCO-CUTANEOUS LEISHMANIASIS: Intradermal test with a promastigote suspension and a crude extract from *leishmania braziliensis*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 19:393-6, 1977

- PESSOA S. B., BARRETO, M.P. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rio de Janeiro: Serviço de Documentação do Ministério da Educação e Saúde. Imprensa Nacional, 1948
- PESSOA S. B., PESTANA, B.R. A intradermorreação de Montenegro nas campanhas sanitárias contra a Leishmaniose. **Arquivos de Higiene, 6**:124-37, 1941
- PESSOA S. B., PESTANA, B.R.. Lesões Iniciais na Leishmaniose Tegumentar Americana. Acta Med., 4:267-71, 1939
- PIRMEZ C., COOPER C., PAES-OLIVEIRA M., SCHUBACH A., TORIGIAN V. K.,

  MODLIN R. L. Immunologic responsiveness in American Cutaneous

  Leishmaniasis lesions. J. Immunol., 145:3100-4, 1990
- QUAYLE A. J., CHOMARAT P., MIOSSEC P., KJELDSEN-KRAGH J., FORRE O., NATVIG J. B. Rheumatoid inflammatory t-cell clones express mostly th1 but also th2 and mixed (th0-like) cytokine patterns. Scand. J. Immunol., 38:75-82, 1993
- REED S. G., BADARO R., MASUR H., CARVALHO E. M., LORENCO R., LISBOA A., TEIXEIRA R., JOHNSON W. D., JR., JONES T. C. Selection of a skin test antigen for American Visceral Leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 35:79-85, 1986

- RIBEIRO-DE-JESUS A., ALMEIDA R. P., LESSA H., BACELLAR O., CARVALHO E. M. Cytokine profile and pathology in Human Leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol.**Res., 31:143-8, 1998
- RIDLEY D. S. The pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop.**Med. Hyg., 73:150-60, 1979
- ROFFI J., DEDET J. P., DESJEUX P., GARRE M. T. Detection of circulating antibodies in Cutaneous Leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

  Am. J. Trop. Med. Hyg., 29:183-9, 1980
- ROMERO G. A., GUERRA M. V., PAES M. G., MACEDO V. O. Comparison of Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania* (viannia) braziliensis and *L.* (v.) guyanensis in Brazil: Therapeutic response to meglumine antimoniate. Am. J. Trop. Med. Hyg., 65:456-65, 2001
- SABROZA P. C., MAIA, A. N. S., SOARES, V. B. Vigilância e monitoramento da Leishmaniose Tegumentar Americana em unidades territoriais Brasil, 1994-2001. Brasilia, DF: Ministério da Saúde Fundação Nacional Saúde, 2002
- SALDANHA A., C.,R., Estudo comparativo entre o Estibogluconato de Sódio e o Antimoniato de Meglumina no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana, na área endêmica de Corte de Pedra Bahia. 1997. Tese de dissertação de mestrado Universidade de Brasília, Brasília.

- SAMPAIO R. N., DE PAULA C. D., SAMPAIO J. H., FURTADO RDE S., LEAL P. P., ROSA T. T., RODRIGUES M. E., VEIGA J. P. The evaluation of the tolerance and nephrotoxicity of Pentavalent Antimony administered in a dose of 40 mg Sb v/kg/day, 12/12 hr, for 30 days in the Mucocutaneous form of Leishmaniasis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 30:457-63, 1997
- SANCHEZ J. L., DINIEGA B. M., SMALL J. W., MILLER R. N., ANDUJAR J. M., WEINA P. J., LAWYER P. G., BALLOU W. R., LOVELACE J. K. Epidemiologic investigation of an outbreak of Cutaneous Leishmaniasis in a defined geographic focus of transmission. Am. J. Trop. Med. Hyg., 47:47-54, 1992
- SANGUEZA P., CARDENAS F. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. New findings on the subject. **Med. Cutan. Ibero. Lat. Am., 9**:25-34, 1981
- SANTOS A. J. O., NASCIMENTO E. G., SILVA M. P., CARVALHO L. C. P. Report on a Visceral and Cutaneous focus in the town of Jequié, State of Bahia. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 35:583-84, 1993
- SCHUBACH A., MARZOCHI M. C., CUZZI-MAYA T., OLIVEIRA A. V., ARAUJO M. L., OLIVEIRA A. L., PACHECO R. S., MOMEN H., CONCEICAO-SILVA F., COUTINHO S. G., MARZOCHI K. B. Cutaneous scars in American Tegumentary Leishmaniasis patients: A site of *Leishmania* (viannia) braziliensis persistence and viability eleven years after Antimonial therapy and clinical cure. Am. J. Trop. Med. Hyg., 58:824-7, 1998

- SENALDI G., XIAO-SU H., HOESSLI D. C., BORDIER C. Serological diagnosis of Visceral Leishmaniasis by a dot-enzyme immunoassay for the detection of a *Leishmania donovani*-related circulating antigen. **J. Immunol. Methods, 193**:9-15, 1996
- SILVA P. La Leishmaniose Cutânea à Bahia. Rev. Med., 15:275-81, 1912
- SILVA T. M. C. A resposta imuno-inflamatória na Leishmaniose Tegumenta Humana. 1999.117. Tese de doutoramento Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- SIMON A. K., SEIPELT E., WU P., WENZEL B., BRAUN J., SIEPER J. Analysis of cytokine profiles in synovial T cell clones from chlamydial reactive arthritis patients: Predominance of the Th1 subset. Clin. Exp. Immunol., 94:122-6, 1993
- THORNE N. The ageing of the skin. Practitioner, 225:1793-800, 1981
- TRENGOVE N. J., BIELEFELDT-OHMANN H., STACEY M. C. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. **Wound Repair**Regen., 8:13-25, 2000
- VAN DE KERKHOF P. C., VAN BERGEN B., SPRUIJT K., KUIPER J. P. Age-related changes in wound healing. Clin. Exp. Dermatol., 19:369-74, 1994

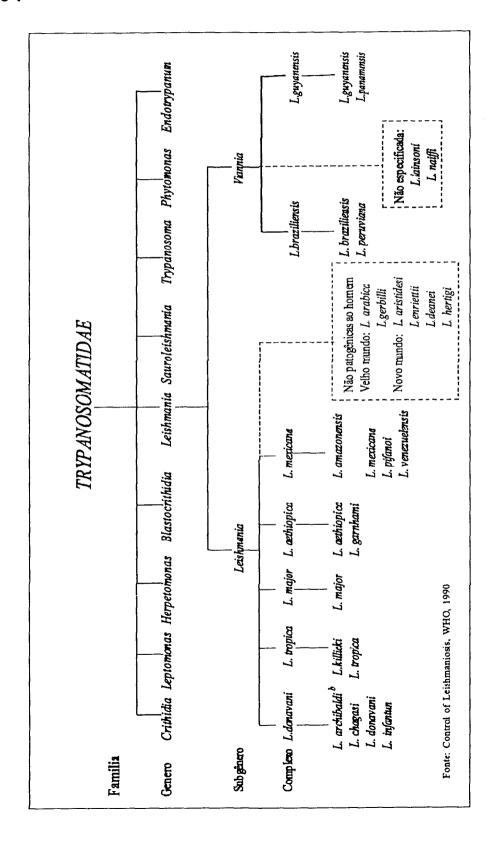
- VERESS B., EL HASSAN A. M. Vascular changes in Human Leishmaniasis: A light microscope and immunohistological study. Ann. Trop. Med. Parasitol., 80:183-8, 1986
- VEXENAT J. A., BARRETTO A. C., CUBA C. C., MARSDEN P. D. Epidemiological characteristics of American Cutaneous Leishmaniasis in an endemic region of the State of Bahia. Iii. Phlebotomine fauna. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 81:293-301, 1986
- WANIDWORANUN C., STROBER W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte II-10 synthesis. J. Immunol., 151:6853-61, 1993
- WEINSTOCK C., KNOBLOCH J., SCHULTHEIS W., NORTHOFF H. Impaired production of cytokines in a case of Human Leishmaniasis. Clin. Infect. Dis., 25:1334-9, 1997
- WEISS P. Epidemiologia y clinica de les Leishmaniosis Tegumentarias en el Peru. Rev. Med. Exper., 2:209-48, 1943
- WHO. The Leishmaniases and Leishmania/HIV co-infections: WHO Fact Sheet, 2000, Vol Revised May

- WILLEMS F., MARCHANT A., DELVILLE J. P., GERARD C., DELVAUX A., VELU T.,

  DE BOER M., GOLDMAN M. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion
  molecule-1 expression on human monocytes. Eur. J. Immunol., 24:1007-9, 1994
- WINDHAGEN A., ANDERSON D. E., CARRIZOSA A., WILLIAMS R. E., HAFLER D. A.
  IL-12 induces human T cells secreting IL-10 with IFN-gamma. J. Immunol.,
  157:1127-31, 1996
- YSSEL H., DE WAAL MALEFYT R., RONCAROLO M. G., ABRAMS J. S., LAHESMAA R., SPITS H., DE VRIES J. E. IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. J. Immunol., 149:2378-84, 1992

## 9 ANEXOS

## 9.1 Anexo 1



#### 9.2 Anexo 2

Equipe:

Médicos Clínicos: Luiz Fabiano Borges Oliveira

André Luiz Barbosa Báfica

Andréia Bomura Rosato

**Edvan Crusoé** 

**Jacson Costa** 

Aldina Barral

Médicos Otorrinolaringologistas: Virgínia Café

Viviane Boaventura

Médicos Patologistas: Luis Antônio Rodrigues Freitas

Tânia Correia

Apoio de Laboratório: Cecília Beatriz Fiúza Favali

Dirceu Joaquim Costa

Apoio logístico: Eliane Góes Nascimento

#### 9.3 Anexo 3

# PROGRAMA DE CONTROLE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA) FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

A- PARTE CLÍNICA	4					
1. Data de Preenchiment	o			N° de Regis	stro _	
2. IDENTIFICAÇÃO						
Nome:				_Apelido:		
Data Nascimento:/_/S	exo:_	Cor:	_ 00	cupação:		_ Peso
Local de Nascimento:	·					
Local Provável de contágio:_						
Última procedência:						
Residência atual:						
Tempo de moradia:	Residé	encia(s) anteri	or(e	s): ( )1-Sim ()2	2- Não	) ( ) 9- NSI
Onde:			⊦	lá quanto tempo	:	meses
Local onde reside (ou contág	jio) ten	n alguém com	LTA	.: ( )1-Sim ( )	2- <b>N</b> ão	) ( ) 9-NSI
Número de familiares em cas	sa (Exc	cluir paciente):				
Número de familiares que tiv	eram l	_TA:		Ano		
3. ANTECEDENTES MÉD	ICOS					
Já teve LTA: ( )1- Sim	(	)2-Não	(	) 9-NSI		
Foi tratado: ( )1- Sim	(	)2- <b>N</b> ão	(	)9-NSI		
Natureza do tratamento	(	)1- Tópico	(	)2-Sistêmico	(	)9-NSI
Droga usada:				Dose:		
Ano de tratamento:		_ Onde foi	trata	do:		
4. ANTECEDENTES FAMIL	IARES	;				
Algum caso de LTA na famíl	lia: (	)1- Sim (	)2-	Não ( )9-i	181	
Nome:				Idade:		
Ano da doença:	Locali	dade:			<del></del>	
Grau de parentesco com o ca	aso inc	dex:				

Nome:			Idade:
Ano da do	ença:	_ Local:	
Grau de pa	arentesco com o	caso index: _	<u></u>
Nome:			ldade:
Ano da do	ença:	_ Local:	
Grau de pa	arentesco com o	caso index: _	
5. SITUAÇ	ÃO EPIDEMIOL	.ÓGICA	
Localizaçã	o do domicílio:(	)1.área urbar	na ( )2.área rural ( )3-Peri-urbana ( )9.NSI
Quantas po	essoas residem	no domicílio:	Nº de cômodos:
Instalações	s sanitárias:	( )1-Sim (	)2-Não ( )9-NSI
Caso sim:			
( ) 1- Der	ntro do domicílio		( ) 2- Fora do domicílio
( ) 3- For	a do domicílio e	comum a vári	ios domicílios ( ) 9-NSI
Cria anima	is no quintal:	( )1- Sim	( )2-Não ( )9-NSI
Caso sim,	qual(is):		
	Galinha	( )1-Sim (	)2-Não ( )9-NSI
	Cavalos	( )1-Sim (	)2-Não ( )9-NSI
	Porcos	( )1-Sim (	)2-Não ( )9-NSI
	Cabras	( )1-Sim (	( )2-Não ( )9-NSI
	Cameiros	( )1-Sim (	( )2-Não ( )9-NSI
	Jumentos	( )1-Sim (	( )2-Não ( )9-NSI
	Cães	( )1-Sim (	( )2-Não ( )9-NSI
Outros	( )1-Sim	( )2-Não	( )9-NSI Qual
Renda fam	niliar mensal (sal	. Mínimos) (	)<1 ( )1a2 ( )3a4( )>4
6. HISTÓI	RIA CLINICA		
<del></del>			

## 7. EXAME FÍSICO

A.Presença de Linfonodos: ( )1.Sim	( )2.Não ( )9.NSI
Caso sim, localização: ( )1. Epitroclear	( )2.Tibial posterior ( )3. Axilar
( )4. Crural ( )5.Cervical ( )	6.Subocciptal ( )7.Submandibular
( )8.Inguinal ( )9. Outros	
Tamanho	do <b>g</b> ânglio
(cm)	
B.Lesão de Pele:( )1.Sim ( )2. Não	) (
	l <sup>o</sup> Total de Lesão(ões):
\$ <b>*</b> * <b>*</b> * * * * * * * * * * * * * * *	Nº Lesão(ões) úlceradas:
	Duração:(meses)
	Localização(ões):
//):\(\(\(\lambda(\lambda)\);\(\lambda(\lambda)\)	Tamanho(s):(cm)
	Caracteristica(s) ( )1.úmida (
The state of the s	)2.vegetante
1/// 1/19	( )3.mínima ( )4. seca (
() () (())	)5.Disseminada
4 1 1 ) X(	( )6.Verucoíde ( )7.Outras ( )9.NSI
φ - OΩ	Nº de Lesão(ões) não úlcerada(s)
	Duração:(meses)
	Localização(ões):
	Tamanho:(cm)
Cicatriz antiga: ( )1.Sim ( )	
)9.NSI	(00)
•	Ouração
(meses)	
Localização(ões):	
Tamanho:(cm)	
C.Lesão Mucosa: ( )1.Sim ( )2.N	lão (
)9.NSI	
Queixa Principal:	
	4/UV \ %

Queixas associadas: ( )1.Prurido ( )2.Dor
( )3.Febre ( )4.Adenite satélite ( )9.NSI
Formas:
( ) 1-mucosa tardia ( )2. mucosa primária
( )3.mucosa indeterminada ( )4.mucosa contígua ( )5.mucosa concomitante
( )6.Outras ( )9.NSI
C.1-Mucosa Nasal Ativa: ( )1.Sim ( )2.Não ( )9.NSi
Queixas nasais: ( )1.Dor ( )2.Secreção ( )3.Sangramento ( )4.Crostas
( )5.Ferimento ( )6.Deformidade ( )7. Outras ( )9.NSI
Secreção Nasal: ( )1.Sim ( )2.Não ( )9.NSI
Crostas: ( )1.Sim ( )2.Não ( Tipo:
)9.NSI
Mucosa nasal (Tipo): ( )1. Infiltração ( )2. Ulceração ( )3. Erosão
( ) 4.Hiperemia ( )4.Edema ( )9NSI
Localização: ( )1.Septo anterior ( )2. Cabeça de concha inferior
( )3. Outras ( )9.NSI
Lesão Mucosa cicatricial: ( )1.Sim ( )2.Não ( )9.NSi
Tipo: ( )1.Cicatriz atrófica ( )2.Retração cicatricial ( )3.Perfuração
( )4.Destruição parcial ( )5.Destruição total
Localização: ( )1.Septo anterior ( )2.Cabeça da concha inferior ( )3.Outras
C.2- Mucosa bucal: ( )1.Sim ( )2.Não ( )9.NSI
Queixas associadas: ( )1.Dor a deglutição ( )2.Roquidão prolongada ( )3.Outros
Localização: ( )1. Palato ( )2. Lábios ( )3.Úvula
)4.Faringe
( )5. Laringe ( )6.Cordas Vocais ( )7. Gengiva
3. Outras mucosas: ( )1. Sim ( )2. Não ( )9.NSI
Qual(ais):
Protusão abdominal: ( )1-Slm ( )2-Não ( )9-NSI
Hepatomegalia: ( )1-Sim ( )2-Não ( )9-NSI
Caso Sim:cm RCDcm Apêndice Xifóide
Esplenomegalia: ( )1-Sim ( )2-Não ( )9-NSI
Caso Sim: cm RCE

#### 8- DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

#### A. EXAMES IMUNOLÓGICOS

ID	DRM	SOROLOGIA: ANO(S)			
Data	Leitura	I.F.I/Data	Título	ELISA/Data	N. Absorbância
		] [			
BIÓPSIA:	( )1.Sim	( )2.Não	( )9.NSI F	FOTO: ( )1.Sin	n ( )2. <b>N</b> ão
)9.NSI	( )	,	( )====================================	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	( )
•	exo: ( )Sim	( )2.Não	( )9.NSI		
	, ,	( ,=::::::::::::::::::::::::::::::::::::	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,		
9- TRATA	MENTO				
Terapêuti	ca atual:				
Droga En	npregada:		Dosage	em Diária:	
Data Iníci	0.	Data Término:			

#### **10-EFEITOS COLATERAIS**

EFEITOS ADVERSOS	DIAS DE TRATAMENTO	
ARTRALGIA		
MIALGIA		
DOR ABDOMINAL		
ANOREXIA		
NAUSEAS		
VOMITOS		
PALPITAÇÕES		
FEBRE		
OUTROS		

# 11- EVOLUÇÃO

Revisão em:	
( ) conduta expectante ( ) alta ambulatorial ( ) novo tratamento comampolas de Si	b+5
Revisão em:	
( ) conduta expectante ( ) alta ambulatorial ( ) novo tratamento comampolas de Si	b+5
Revisão em:	
( ) conduta expectante ( ) alta ambulatorial ( ) novo tratamento comampolas de Sl	b+5

#### 9.4 Anexo 4

#### TERMO DE CONSENTIMENTO

# INVESTIGAÇÃO DOS MARCADORES CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR HUMANA

Eu,	,fui informado de
que este estudo é uma pesquisa e que seu objetivo é determinar	a relação entre
resposta Imune, os dados clínicos e a evolução da doença. A participa	ção neste estudo
prevê a doação de sangue, a realização de testes cutâneos IDRM	l, e obtenção de
biópsia de uma lesão.	

- O procedimento será o seguinte: Doarei 20ml de sangue antes do início do tratamento.
- 2. Os possíveis desconfortos e riscos inerentes a este procedimento são aqueles relacionados à retirada de sangue venoso. Dor local e, mais raramente, infecção podem ocorrer. Este procedimento é médico de rotina e todos os cuidados apropriados serão tomados.
- Com limpeza da lesão e anestesia local será realizada uma biópsia de 4mm de uma das lesões com a finalidade diagnóstica.

Os resultados serão discutidos comigo e considerados confidenciais. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes. Dr. Jackson Costa, Dra, Aldina Barral, ou Dra Andréia Bomura discutiu comigo esta informação e colocou-se a disposição para responder minhas perguntas. Se eu tiver novas perguntas, eu poderei entrar em contato com o

responsável pelo estudo Dr. Luiz Fabiano Borges Oliveira, pelo telefone (xx71) 356-8782 ramal 286.

Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, e eu sou livre para recusar participar do estudo, ou me retirar em qualquer época após seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que devo receber. Recebi uma cópia deste formulário e tive a oportunidade de lê-lo. Pela presente consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que o procedimento descrito acima sejam realizados em minha pessoa.

Paciente assinatura	Nº.Registro Geral
Testemunha assinatura	Nº.Registro Geral
Médico assistente assinatura	DATA

Se o (a) senhor (a) tiver qualquer dúvida sobre a participação neste estudo pode contactar com Dra.-Aldina Barral ou Dr.Jackson Costa pelo telefone (071) 356::-8782 Ramal 259

## 9.5 Anexo 5

	SEXO	ADENOPATIA	MONTENEGRO	LOCAL DA LESÃO
Chave	e			
1	FEMININO	NÃO	NÃO	MMII
2	FEMININO	SIM	SIM	MMII
3	FEMININO		SIM	VARIOS
4	MASCULINO	NÃO	SIM	MMSS
5	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
6	FEMININO	SIM	NÃO	MMII
7	MASCULINO	SIM	SIM	FACE
8	MASCULINO	NÃO	SIM	MMSS
9	MASCULINO	SIM	SIM	TRONCO
10	MASCULINO	NÃO	NÃO	MMSS
11	MASCULINO		SIM	MMSS
12	MASCULINO		SIM	MMII
13	MASCULINO	NÃO	SIM	MMII
14	FEMININO	NÃO	SIM	MMSS
15	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
16	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
17	MASCULINO	SIM	SIM	FACE
18	FEMININO	NÃO	NÃO	MMII
19	MASCULINO		SIM	MMII
20	MASCULINO	SIM	NÃO	MMII
21	FEMININO	NÃO	SIM	MMSS
22	FEMININO	SIM	SIM	MMII
23	MASCULINO	NÃO	SIM	MMII
24	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
25	MASCULINO	SIM	·	FACE
26	FEMININO	SIM	NÃO	MMII
27	FEMININO	SIM	NÃO	MMSS
28	MASCULINO		SIM	MMII
29	MASCULINO	NÃO	SIM	MMSS
30	MASCULINO	NÃO	SIM	MMSS

30	MASCULINO	NÃO	SIM	MMSS
31	MASCULINO	NÃO	SIM	TRONCO
32	FEMININO	SIM	SIM	MMII
33	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
34	FEMININO	SIM	SIM	MMII
35	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
36	FEMININO	NÃO	SIM	MMII
37	MASCULINO	SIM	NÃO	MMII
38	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
`39	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
40	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
41	MASCULINO		SIM	MMII
42	MASCULINO	SIM	NÃO	MMSS
43	MASCULINO	NÃO	NÃO	MMSS
44	FEMININO	SIM	SIM	MMSS
45	MASCULINO	NÃO	SIM	MMII
46	FEMININO	NÃO		MMSS
47	MASCULINO	SIM	NÃO	VARIOS
48	FEMININO	SIM	SIM	MMII
49	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
50	MASCULINO	NÃO	SIM	MMII
51	MASCULINO	SIM	NÃO	MMII
52	MASCULINO	NÃO	SIM	MMII
53	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
54	MASCULINO	NÃO	SIM	MMSS
55	FEMININO	SIM	SIM	MMII
56	FEMININO	NÃO		MMII
57	MASCULINO	NÃO	SIM	MMII
58	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
59	MASCULINO	SIM	NÃO	VARIOS
60	FEMININO	NÃO		MMSS
61	MASCULINO	SIM	SIM	FACE
62	FEMININO	SIM	SIM	MMSS
63	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
64	FEMININO		NÃO	MMII
65	FEMININO	SIM	SIM	MMII
66	FEMININO	SIM	SIM	MMII
67	MASCULINO	SIM	SIM	FACE
68	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
69	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
70	MASCULINO	SIM		MMII
71	MASCULINO	NÃO	SIM	TRONCO
72	FEMININO		SIM	MMII
73	MASCULINO	NÃO	NÃO	VARIOS

74	MASCULINO	NÃO	SIM	MMII
75	MASCULINO		SIM	MMII
76	FEMININO			MMII
77	MASCULINO	SIM	SIM	MMSS
78	FEMININO	NÃO	NÃO	MMII
79	FEMININO	NÃO	SIM	MMII
80	MASCULINO	NÃO	SIM	MMSS
81	FEMININO	NÃO	SIM	MMII
82	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
83	MASCULINO	NÃO	SIM	MMII
84	FEMININO	NÃO	SIM	MMII
85	FEMININO	SIM	SIM	MMSS
86	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
87	FEMININO	SIM	SIM	MMII
88	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
89	MASCULINO		SIM	MMII
90	MASCULINO		SIM	VARIOS
91	MASCULINO	SIM	SIM	MMII
92	FEMININO	NÃO	SIM	TRONCO

Chave	IDADE	TEMPO DE CURA	TAMANHO DA LESÃO	TEMPO DE LESÃO	DOSE
1	16			30	120
2	9	60	1	30	25
3	76	60	3	300	26
4	25	90	2	60	80
5	17	75	3	15	80
6	87	90	5	28	80
7	15	30	1	60	4
8	34	60	3	60	24
9	22	45		60	60
10	59	90	2	20	80

12         34         60         3         120         94           13         25         90         2         60         60           14         43         60         150         80           15         33         60         7         60         80           16         16         120         28         140           17         15         30         2         120         40           18         67         30         3         30         40           19         46         100         60         100           20         9         30         2         21         20           21         53         60         4         60         80           22         12         90         3         15         80           23         69         120         3         14         40           24         21         180         5         60         60           25         12         90         2         30         60           25         12         90         2         30         60           25	11	43	60		20	80
13         25         90         2         60         60           14         43         60         150         80           15         33         60         7         60         80           16         16         120         28         140           17         15         30         2         120         40           18         67         30         3         30         40           19         46         100         60         100           20         9         30         2         21         20           21         53         60         4         60         80           22         12         90         3         15         80           23         69         120         3         14         40           24         21         180         5         60         60           25         12         90         2         30         60           25         12         90         2         30         60           28         17         4         90         120           28         17	12	34	60	3	120	94
14         43         60         7         60         80           15         33         60         7         60         80           16         16         120         28         140           17         15         30         2         120         40           18         67         30         3         30         40           19         46         100         60         100           20         9         30         2         21         20           21         53         60         4         60         80           22         12         90         3         15         80           23         69         120         3         14         40           24         21         180         5         60         60           25         12         90         2         30         60           25         12         90         2         30         60           26         23         80         2         120         58           27         25         90         4         60         100		25	90		60	60
15         33         60         7         60         80           16         16         120         28         140           17         15         30         2         120         40           18         67         30         3         30         40           19         46         100         60         100           20         9         30         2         21         20           21         53         60         4         60         80           22         12         90         3         15         80           22         12         90         3         15         80           23         69         120         3         14         40           24         21         180         5         60         60           25         12         90         2         30         60           25         12         90         2         30         60           28         17         4         90         120           29         37         60         3         14         100           30<			60		150	80
16         16         120         28         140           17         15         30         2         120         40           18         67         30         3         30         40           19         46         100         60         100           20         9         30         2         21         20           21         53         60         4         60         80           22         12         90         3         15         80           23         69         120         3         14         40           24         21         180         5         60         60           25         12         90         2         30         60           25         12         90         2         30         60           26         23         80         2         120         58           27         25         90         4         60         100           28         17         4         90         120           29         37         60         3         14         100           3			60	7	60	80
17         15         30         2         120         40           18         67         30         3         30         40           19         46         .100         60         100           20         9         30         2         21         20           21         53         60         4         60         80           22         12         90         3         15         80           23         69         120         3         14         40           24         21         180         5         60         60         25         12         90         2         30         60           25         12         90         2         30         60         60         2         30         60           25         12         90         2         30         60         2         30         60         2         30         60         2         30         60         2         30         60         100         30         14         100         30         14         100         30         30         30         30         30 <td< td=""><td></td><td></td><td>120</td><td></td><td></td><td>140</td></td<>			120			140
18         67         30         3         30         40           19         46         100         60         100           20         9         30         2         21         20           21         53         60         4         60         80           22         12         90         3         15         80           23         69         120         3         14         40           24         21         180         5         60         60           25         12         90         2         30         60           26         23         80         2         120         58           27         25         90         4         60         100           28         17         4         90         120           28         17         4         90         120           30         10         60         2         90         36           31         38         30         2         60         50           32         31         33         1         15         46           33 <td></td> <td></td> <td>30</td> <td>2</td> <td><del></del></td> <td>40</td>			30	2	<del></del>	40
19         46         100         60         100           20         9         30         2         21         20           21         53         60         4         60         80           22         12         90         3         15         80           23         69         120         3         14         40           24         21         180         5         60         60           25         12         90         2         30         60           26         23         80         2         120         58           27         25         90         4         60         100           28         17         4         90         120           28         17         4         90         120           29         37         60         3         14         100           30         10         60         2         90         36           31         38         30         2         60         50           32         31         33         1         15         46           33 </td <td></td> <td></td> <td>30</td> <td></td> <td>30</td> <td>40</td>			30		30	40
20         9         30         2         21         20           21         53         60         4         60         80           22         12         90         3         15         80           23         69         120         3         14         40           24         21         180         5         60         60           25         12         90         2         30         60           26         23         80         2         120         58           27         25         90         4         60         100           28         17         4         90         120           29         37         60         3         14         100           30         10         60         2         90         36           31         38         30         2         60         50           32         31         33         1         15         46           33         31         60         30         80           34         7         60         4         30         20		46	, 100		60	100
21         53         60         4         60         80           22         12         90         3         15         80           23         69         120         3         14         40           24         21         180         5         60         60           25         12         90         2         30         60           26         23         80         2         120         58           27         25         90         4         60         100           28         17         4         90         120           29         37         60         3         14         100           30         10         60         2         90         36           31         38         30         2         60         50           32         31         33         1         15         46           33         31         60         30         80           34         7         60         4         30         20           35         5         90         2         90         16		9	30	2	21	20
22         12         90         3         15         80           23         69         120         3         14         40           24         21         180         5         60         60           25         12         90         2         30         60           26         23         80         2         120         58           27         25         90         4         60         100           28         17         4         90         120           29         37         60         3         14         100           30         10         60         2         90         36           31         38         30         2         60         50           32         31         33         1         15         46           33         31         60         30         80           34         7         60         4         30         20           35         5         90         2         90         16           36         14         34         2         60         40		53	60		60	80
23         69         120         3         14         40           24         21         180         5         60         60           25         12         90         2         30         60           26         23         80         2         120         58           27         25         90         4         60         100           28         17         4         90         120           29         37         60         3         14         100           30         10         60         2         90         36           31         38         30         2         60         50           32         31         33         1         15         46           33         31         60         30         80           34         7         60         4         30         20           35         5         90         2         90         16           36         14         34         2         60         40           37         28         90         3         150         80		12	90	3	15	80
24         21         180         5         60         60           25         12         90         2         30         60           26         23         80         2         120         58           27         25         90         4         60         100           28         17         4         90         120           29         37         60         3         14         100           30         10         60         2         90         36           31         38         30         2         60         50           32         31         33         1         15         46           33         31         60         30         80           34         7         60         4         30         20           35         5         90         2         90         16           36         14         34         2         60         40           37         28         90         3         150         80           38         14         270         3         30         200 <tr< td=""><td></td><td>69</td><td>120</td><td></td><td>14</td><td>40</td></tr<>		69	120		14	40
26         23         80         2         120         58           27         25         90         4         60         100           28         17         4         90         120           29         37         60         3         14         100           30         10         60         2         90         36           31         38         30         2         60         50           32         31         33         1         15         46           33         31         60         30         80           34         7         60         4         30         20           35         5         90         2         90         16           36         14         34         2         60         40           37         28         90         3         150         80           38         14         270         3         30         200           39         15         120         2         120         80           40         34         60         6         40         80 <t< td=""><td></td><td>21</td><td>180</td><td>5</td><td>60</td><td>60</td></t<>		21	180	5	60	60
27         25         90         4         60         100           28         17         4         90         120           29         37         60         3         14         100           30         10         60         2         90         36           31         38         30         2         60         50           32         31         33         1         15         46           33         31         60         30         80           34         7         60         4         30         20           35         5         90         2         90         16           36         14         34         2         60         40           37         28         90         3         150         80           38         14         270         3         30         200           39         15         120         2         120         80           40         34         60         6         40         80           41         16         60         2         6         60 <trr< td=""><td></td><td>12</td><td>90</td><td>2</td><td>30</td><td>60</td></trr<>		12	90	2	30	60
27         25         90         4         60         100           28         17         4         90         120           29         37         60         3         14         100           30         10         60         2         90         36           31         38         30         2         60         50           32         31         33         1         15         46           33         31         60         30         80           34         7         60         4         30         20           35         5         90         2         90         16           36         14         34         2         60         40           37         28         90         3         150         80           38         14         270         3         30         200           39         15         120         2         120         80           40         34         60         6         40         80           41         16         60         2         6         60 <trr< td=""><td>26</td><td>23</td><td>80</td><td>2</td><td>120</td><td>58</td></trr<>	26	23	80	2	120	58
29       37       60       3       14       100         30       10       60       2       90       36         31       38       30       2       60       50         32       31       33       1       15       46         33       31       60       30       80         34       7       60       4       30       20         35       5       90       2       90       16         36       14       34       2       60       40         37       28       90       3       150       80         38       14       270       3       30       200         39       15       120       2       120       80         40       34       60       6       40       80         41       16       60       2       6       60         42       62       45       8       40       40         43       13       60       30       40         44       27       110       2       60       90         45       49		25	90		60	100
30         10         60         2         90         36           31         38         30         2         60         50           32         31         33         1         15         46           33         31         60         30         80           34         7         60         4         30         20           35         5         90         2         90         16           36         14         34         2         60         40           37         28         90         3         150         80           38         14         270         3         30         200           39         15         120         2         120         80           40         34         60         6         40         80           41         16         60         2         6         60           42         62         45         8         40         40           43         13         60         30         40           44         27         110         2         60         90		17		4	90	120
31     38     30     2     60     50       32     31     33     1     15     46       33     31     60     30     80       34     7     60     4     30     20       35     5     90     2     90     16       36     14     34     2     60     40       37     28     90     3     150     80       38     14     270     3     30     200       39     15     120     2     120     80       40     34     60     6     40     80       41     16     60     2     6     60       42     62     45     8     40     40       43     13     60     30     40       44     27     110     2     60     90       45     49     90     60     100       46     61     60     2     60     40       47     43     60     2     60     40       47     43     60     2     60     16       48     20     60     2     30     60   <		37	60	3	14	100
31     38     30     2     60     50       32     31     33     1     15     46       33     31     60     30     80       34     7     60     4     30     20       35     5     90     2     90     16       36     14     34     2     60     40       37     28     90     3     150     80       38     14     270     3     30     200       39     15     120     2     120     80       40     34     60     6     40     80       41     16     60     2     6     60       42     62     45     8     40     40       43     13     60     30     40       44     27     110     2     60     90       45     49     90     60     100       46     61     60     2     60     40       47     43     60     2     60     40       47     43     60     2     60     16       48     20     60     2     30     60   <	30	10	60	2	90	36
32     31     33     1     15     46       33     31     60     30     80       34     7     60     4     30     20       35     5     90     2     90     16       36     14     34     2     60     40       37     28     90     3     150     80       38     14     270     3     30     200       39     15     120     2     120     80       40     34     60     6     40     80       41     16     60     2     6     60       42     62     45     8     40     40       43     13     60     30     40       44     27     110     2     60     90       45     49     90     60     100       46     61     60     2     60     40       47     43     60     2     60     40       47     43     60     2     60     16       48     20     60     2     30     60       49     27     105     45     90		38	30	2	60	50
33     31     60     30     80       34     7     60     4     30     20       35     5     90     2     90     16       36     14     34     2     60     40       37     28     90     3     150     80       38     14     270     3     30     200       39     15     120     2     120     80       40     34     60     6     40     80       41     16     60     2     6     60       42     62     45     8     40     40       43     13     60     30     40       44     27     110     2     60     90       45     49     90     60     100       46     61     60     2     60     40       47     43     60     2     60     40       47     43     60     2     30     60       49     27     105     45     90       50     16     60     5     180     60       51     38     30     42     40	32	31	33	1	15	46
35         5         90         2         90         16           36         14         34         2         60         40           37         28         90         3         150         80           38         14         270         3         30         200           39         15         120         2         120         80           40         34         60         6         40         80           41         16         60         2         6         60           42         62         45         8         40         40           43         13         60         30         40           44         27         110         2         60         90           45         49         90         60         100           46         61         60         2         60         40           47         43         60         2         60         40           47         43         60         2         30         60           48         20         60         2         30         60 <tr< td=""><td></td><td>31</td><td>60</td><td></td><td>30</td><td>80</td></tr<>		31	60		30	80
36         14         34         2         60         40           37         28         90         3         150         80           38         14         270         3         30         200           39         15         120         2         120         80           40         34         60         6         40         80           41         16         60         2         6         60           42         62         45         8         40         40           43         13         60         30         40           44         27         110         2         60         90           45         49         90         60         100           46         61         60         2         60         40           47         43         60         2         60         16           48         20         60         2         30         60           49         27         105         45         90           50         16         60         5         180         60           51	34	7	60	4	30	20
37     28     90     3     150     80       38     14     270     3     30     200       39     15     120     2     120     80       40     34     60     6     40     80       41     16     60     2     6     60       42     62     45     8     40     40       43     13     60     30     40       44     27     110     2     60     90       45     49     90     60     100       46     61     60     2     60     40       47     43     60     2     60     16       48     20     60     2     30     60       49     27     105     45     90       50     16     60     5     180     60       51     38     30     42     40	35	5	90	2	90	16
38       14       270       3       30       200         39       15       120       2       120       80         40       34       60       6       40       80         41       16       60       2       6       60         42       62       45       8       40       40         43       13       60       30       40         44       27       110       2       60       90         45       49       90       60       100         46       61       60       2       60       40         47       43       60       2       60       16         48       20       60       2       30       60         49       27       105       45       90         50       16       60       5       180       60         51       38       30       42       40	36	14	34	2	60	40
39     15     120     2     120     80       40     34     60     6     40     80       41     16     60     2     6     60       42     62     45     8     40     40       43     13     60     30     40       44     27     110     2     60     90       45     49     90     60     100       46     61     60     2     60     40       47     43     60     2     60     16       48     20     60     2     30     60       49     27     105     45     90       50     16     60     5     180     60       51     38     30     42     40	37	28	90	3	150	80
40       34       60       6       40       80         41       16       60       2       6       60         42       62       45       8       40       40         43       13       60       30       40         44       27       110       2       60       90         45       49       90       60       100         46       61       60       2       60       40         47       43       60       2       60       16         48       20       60       2       30       60         49       27       105       45       90         50       16       60       5       180       60         51       38       30       42       40	38	14	270	3	30	200
41     16     60     2     6     60       42     62     45     8     40     40       43     13     60     30     40       44     27     110     2     60     90       45     49     90     60     100       46     61     60     2     60     40       47     43     60     2     60     16       48     20     60     2     30     60       49     27     105     45     90       50     16     60     5     180     60       51     38     30     42     40	39	15	120	2	120	80
42       62       45       8       40       40         43       13       60       30       40         44       27       110       2       60       90         45       49       90       60       100         46       61       60       2       60       40         47       43       60       2       60       16         48       20       60       2       30       60         49       27       105       45       90         50       16       60       5       180       60         51       38       30       42       40	40	34	60	6	40	80
43       13       60       30       40         44       27       110       2       60       90         45       49       90       60       100         46       61       60       2       60       40         47       43       60       2       60       16         48       20       60       2       30       60         49       27       105       45       90         50       16       60       5       180       60         51       38       30       42       40	41	16	60	2	6	60
44     27     110     2     60     90       45     49     90     60     100       46     61     60     2     60     40       47     43     60     2     60     16       48     20     60     2     30     60       49     27     105     45     90       50     16     60     5     180     60       51     38     30     42     40	42	62	45	8	40	40
45     49     90     60     100       46     61     60     2     60     40       47     43     60     2     60     16       48     20     60     2     30     60       49     27     105     45     90       50     16     60     5     180     60       51     38     30     42     40	43	13	60		30	40
46     61     60     2     60     40       47     43     60     2     60     16       48     20     60     2     30     60       49     27     105     45     90       50     16     60     5     180     60       51     38     30     42     40	44	27	110	2	60	90
47     43     60     2     60     16       48     20     60     2     30     60       49     27     105     45     90       50     16     60     5     180     60       51     38     30     42     40	45	49	90		60	100
48     20     60     2     30     60       49     27     105     45     90       50     16     60     5     180     60       51     38     30     42     40	46	61	60	2	60	40
49     27     105     45     90       50     16     60     5     180     60       51     38     30     42     40	47	43	60	2	60	16
50     16     60     5     180     60       51     38     30     42     40	48	20	60	2	30	60
51 38 30 42 40	49	27	105		45	90
	50	16	60	5	180	60
52 18 85 1 60 40	51	38	30		42	40
	52	18	85	1	60	40



53	22		4	15	40
54	43	30	2	120	40
55	45	30	3	15	40
56	61	90	3	30	40
57	37		10	120	80
58	18	60	3	45	40
59	38	120	7	50	100
60	45	90	2	30	40
61	39	60	5	90	60
62	58	210	2	60	90
63	21	60	5	30	40
64	36	90		30	80
65	60	60	1	150	40
66	19	40	1	15	60
67	7	60	1	45	40
68	25	60	5	60	40
69	19	90	5	60	40
70	29	150	5	30	80
71	18	90	2	30	100
72	63	240	3	25	100
73	51	150	4	60	80
74	54	120	5	60	60
75	51	105	4	30	69
76	28	60	2	30	36
77	67	90	4	30	120_
78	19	60		30	30
79	37	30	3	90	40
80	20	120	2	15	100
81	10	95	2	15	16
82	38	30	1	90	60
83	5	78	3	30	30
84	16	90	2	30	60
85	11	320	3	30	48
86	49	122	3	30	70
87	71	150	3	30	40
88	20		3	30	40
89	19		2	30	40
90	5	30	1	180	15
91	26	60	4	15	53
92	18	90	2	60	80

	QUANTIDADE		IFN-	TNF-	IFN-	IL-10	TNF-
	DE LESÕES	IL-10	GAMMA	ALFA	GAMMA Plasma	PLASMA	GAMMA PLASMA
Chave							
1	ATÉ 4	0	574,41	11,79	0	0	0
2	1	0	2051,4	54	0	0	0
3	ATÉ 4	0	3393,4	751,7	0	0	0
4	1	0		366,1	0	0	0
5	1	0,332	1002,9	11	0	0	0
6	1	1,33		1434	0	0	0
7	1	2,485	2762	162,8	0	0	0
8	1	2,739	2752,9	186,9	0	0	0
9	1	5,286		1396	0	0	0
10	11	8,961	1551,5	58,38	0	0	0
11	1	9,435	943,92	60,1	0	0	0
12	1	18,9	2830	355,3	0	0	0
13	11		1626,3	19,77	0	0	0
14	11		1918,7	1,692	0	0	0
15	11			995,3	0	0	0
16	11			0	0	0	0
17	ATÉ 4			0	8,526	0	0
18	1	0	4026	89,09	9,458	0	0
19	1	0	433,87	11,2	18,526	0	0
20	ATÉ 4		1352	109,8	60,032	0	0
21	1	9,87	2734,8	892	65,052	0	0
22	1	0	1698,2	74,44	108,192	0	147,368
23	1	126,4	2944,4		0	2,476	0
24	1		1256,8	251,7	0	2,476	0
25	1	0	587,82	23,06	82,866	2,476	130,432
26	1	7,692	2462,8	859,9	184,082	8,294	79,552
27	1	0	383,99	81,73	0	10,904	0
28	ATÉ 4	2,746		62,76	24,358	10,904	175,576
29	11	27,4	2562,2	643,6	11,248	13,41	0
30	11	7,82	1426,5	141,3	0	15,836	0

31	1	0		34,13	27,132	15,836	0
32	1	2,953	853,24	44,15	0	18,202	338,98
33	1	3,677	2125	483,8	0	20,516	0
34	1		1690,1	231,2	0	22,786	73,89
35	1	0	1649,3	114,9	0	25,018	0
36	1	37,26	2779,6	165,9	0	25,018	0
37	ATÉ 4	0	0	0	174,73	25,018	62,558
38	1	0,688		185,8	0	27,218	0
39	1	0	2529,3	1752	1,844	29,388	0
40	ATÉ 4	1,111	2873,8	483,1	0	31,534	0
41	1	0,816	2120,4	107,3	0	33,654	0
42	1	0	1752,5	0	18,526	43,97	0
43	1	1,546	1697,9	47,01	0	69,276	0
44	1	21,11	3463,8	519,6	104,12	71,16	260,122
45	ATÉ 4	8,087	3475	578,7	0	82,322	937,058
46	1	0	2056	3,787	149,12	104,068	575,604
47	ATÉ 4	0,165		10,22	0	140,882	0
<b>4</b> 8	1	0	504,5	0	67,258	161,444	0
49	1	0,478	0	7,331	48,522	663,826	22,772
50	1	0,415	2143,1	135,2	0	933,714	479,796
51	1	0	0				
52	1	0	0				
53	1	0	0				
54	1	0	1314,2				
55	1	0	1428,3				
56	ATÉ 4	0	1656,5	936,7			
57	1	0	1977,1	11,55			
58	1	0	2475,3				
59	ATÉ 4	0	2512,6				
60	ATÉ 4	0	2593	232,5			
61	1	10,43	2866,3	1847			
62	ATÉ 4	16,04	2766,9				
63	ATÉ 4	21		395,7			
64	1		980,19				
65	1		1356	0			
66	ATÉ 4						·
67	1						
68	1						
69	1	ļ					
70	1						
71	ATÉ 4						
72	ATÉ 4	<u> </u>					

73	ATÉ 4			
74	1			
75	ATÉ 4			
76	1			
77	1			
78	1			
79	1			
80	ATÉ 4			
81	1			
82	1			
83	1			
84	1			
85	1			
86	ATÉ 4			
87	1			
88	1			
89	1			
90	ATÉ 4			
91	ATÉ 4			
92	ATÉ 4			-