

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

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

**ESTUDO DE RECEPTOR OPIOIDE μ EM LESÕES CUTÂNEAS DE DOENÇAS
INFECCIOSAS GRANULOMATOSAS**

PATRICIA ELIZABETH PIGNATARO

Rio de Janeiro
2020

TESE DE DOUTORADO PCDI-INI P. E. PIGNATARO 2020

PATRÍCIA ELIZABETH PIGNATARO

**ESTUDO DE RECEPTOR OPIOIDE M EM LESÕES CUTÂNEAS DE DOENÇAS
INFECCIOSAS GRANULOMATOSAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação *stricto sensu* em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Doutora em Ciências, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel e do Prof. Dr. Leonardo Pereira Quintella

Rio de Janeiro

2020

PATRÍCIA ELIZABETH PIGNATARO

**ESTUDO DE RECEPTOR OPIODE M EM LESÕES CUTÂNEAS DE DOENÇAS
INFECCIOSAS GRANULOMATOSAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação
stricto sensu em Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto Nacional de
Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do
grau de Doutora em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra Maria Inês Fernandes Pimentel

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Pereira Quintella

BANCA EXAMINADORA

Aprovado em:

Maria Clara Gutierrez Galhardo
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas- Fiocruz

Roberta Olmo Pinheiro
Instituto Oswaldo cruz- Fiocruz

Marcelo Rosandiski Lyra
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas- Fiocruz
(Presidente)

Liliane de Fátima Antonio Oliveira
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas- Fiocruz
Revisora

Verônica Schimtz Pereira
Instituto Oswaldo cruz- Fiocruz

Manoel Evangelista Marques (Suplente)
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas- Fiocruz

Este trabalho é dedicado aos meus filhos, Sofia e Augusto, e ao meu genro Michael Weiss.

AGRADECIMENTOS

Aos Coordenadores da pós-graduação e aos meus orientadores sem os quais não teria oportunidades de fazer este trabalho

À equipe do VIGILEISH do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, e do LAHAN do Instituto Oswaldo Cruz), por me ajudarem a realizar este trabalho.

A Priscila de Sá, pessoa fundamental na secretaria de pós-graduação, pela disponibilidade, carinho e atenção.

À professora Raquel Vasconcellos, pela ajuda em estatística.

Pignataro, P.E. **Estudo de receptor opioide μ em lesões cutâneas de doenças infecciosas granulomatosas.** Rio de Janeiro, 2020, 95 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz.

RESUMO

Receptores opióides e seus agonistas são estudados nos mecanismos de dor e inflamação em geral. O receptor opioide μ (MOR) está relacionado indiretamente à produção de citocinas, sendo provavelmente o principal cofator na proliferação da epiderme, através do fator nuclear kappa de células B ativadas (NF- κ B). O efeito na inflamação ocorre através de citocinas tais como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL) 4, IL-10 e IL-12, mas não em IL-1 β . Existem controvérsias quanto à influência na imunomodulação e repercussão na inflamação. A inflamação neurogênica consiste na liberação de neuropeptídeos cutâneos pró-inflamatórios diante de um estímulo nociceptivo que corre por via axonal, que ocorre na hanseníase. A inflamação infecciosa não neurogênica é desencadeada por um agente patógeno que promove o desequilíbrio da homeostase e portanto o processo inflamatório é iniciado por detecção do agente envolvendo várias células do sistema imune, mediadores moleculares e vasos sanguíneos como acontece em pacientes com leishmaniose cutânea e esporotricose. A dor está frequentemente referida nas lesões de esporotricose, e geralmente quase não tem expressão clínica nas lesões de leishmaniose cutânea. Na hanseníase multibacilar forma lepromatosa (LL), a presença de eritema nodoso hansênico constitui paradigma de inflamação neurogênica. Neste estudo procurou-se correlacionar a expressão do receptor opioide μ com inflamações granulomatosas de origem neurogênica (hanseníase) e não neurogênica (leishmaniose cutânea e esporotricose). Avaliar a expressão de MOR nas lesões cutâneas de esporotricose e leishmaniose cutânea, correlacionando aspectos histopatológicos com as queixas de dor, e avaliar a expressão de MOR nos pacientes com hanseníase multibacilar (LL) com e sem episódios reacionais tipo eritema nodoso hansênico. Fragmentos de lesões cutâneas obtidos por procedimento de biópsia foram submetidos à análise histológica e imunohistoquímica para MOR. Resultados: Os resultados indicam que a expressão de MOR não se associou com a manifestação clínica da presença ou ausência de dor nas lesões de esporotricose e de leishmaniose cutânea. Pacientes com hanseníase procedentes da Fiocruz, com forma lepromatosa (LL) foram estudados na forma basal e em vigência de quadro reacional tipo 2. O eritema nodoso hansênico (ENH) é uma complicação inflamatória dolorosa que ocorre em cerca de 50% dos pacientes com forma LL, particularmente naqueles com índice bacteriano acima de 4+. A histologia de lesões de pele de ENH mostrou hiperplasia da epiderme seguida por um processo inflamatório com neutrófilos. Reação de imunohistoquímica foi realizada com anticorpo anti-MOR em fragmentos parafinados. O grupo LL sem quadro reacional demonstrou marcação leve a moderada para receptor opioide μ nos macrófagos, e 46% revelaram positividade na epiderme. No grupo ENH, 88,9% apresentaram coloração forte na epiderme e nenhuma coloração na maioria dos macrófagos ($p = 0,02$). Na hanseníase multibacilar (LL), os achados sugerem que os queratinócitos participam ativamente no ENH, e a expressão de MOR indica indiretamente que os opióides podem atuar como moduladores na inflamação.

Palavras-Chave: Receptor opioide μ ; Leishmaniose cutânea; Esporotricose; Hanseníase multibacilar; Eritema nodoso hansênico; Dor; Inflamação neurogênica.

Pignataro, P. E. **Study of μ opioid receptor in skin lesions of granulomatous infectious diseases.** Rio de Janeiro, 2020, 95 f. Thesis [Doctorate in Clinical Research in Infectious Diseases] - Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases - Oswaldo Cruz Foundation.

ABSTRACT

Opioid receptors and their agonists are studied in the mechanisms of pain and inflammation in general. The μ opioid receptor (MOR) is indirectly related to cytokine production and is probably the main cofactor in epidermal proliferation through the activated B cell nuclear factor kappa (NF- κ B). The effect on inflammation occurs through cytokines such as tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL) 4, IL-10 and IL-12, but not IL-1 β . There is controversy regarding the influence on immunomodulation and repercussion on inflammation. Neurogenic inflammation is the release of proinflammatory cutaneous neuropeptides in response to an axonal nociceptive stimulation. While non-neurogenic inflammation is triggered by a pathogen agent that promotes the imbalance of homeostasis and therefore the inflammatory process is initiated by detection of the agent involving various immune system cells, molecular mediators and blood vessels. As example of non neurogenic inflammation are cutaneous leishmaniasis and sporotrichosis. The pain is often referred to in sporotrichosis lesions, and generally has almost no clinical expression in cutaneous leishmaniasis lesions. In lepromatous leprosy, the presence of leprosy erythema nodosum is a paradigm of neurogenic inflammation. In this study we sought to correlate the expression of MOR with granulomatous inflammation of neurogenic (leprosy) and non-neurogenic (cutaneous leishmaniasis and sporotrichosis) origin. To evaluate the expression of MOR in cutaneous lesions of sporotrichosis and leishmaniasis, correlating histopathological aspects with complaints of pain, and to evaluate the expression of μ opioid receptor in patients with lepromatous leprosy with and without type-2 leprosy reaction episodes. Fragments of skin lesions obtained by biopsy procedure were submitted to histological and immunohistochemical analysis for MOR. Although MOR was present in variable intensity in all skin fragments, there was no correlation between the presence or absence of pain in the sporotrichosis or leishmaniasis skin lesions with the histological aspects. The results indicate that the expression of MOR was not associated with the clinical manifestation of the presence or absence of pain in sporotrichosis and cutaneous leishmaniasis lesions. Leprosy patients from Fiocruz, with lepromatous form (LL) were studied at baseline and when suffering a type 2 reaction. Erythema nodosum leprosum (ENL) is a painful inflammatory complication that affects about 50% of patients with LL form, particularly those with bacterial index above 4 +. The histology of ENL skin lesions showed epidermal hyperplasia followed by an inflammatory process with neutrophils. Immunohistochemistry reaction was performed with anti-MOR antibody in paraffin-embedded fragments. The LL group without reaction showed mild to moderate MOR labeling in macrophages, and 46% showed positivity in the epidermis. In the ENL group, 88.9% showed strong staining in the epidermis and no staining in most macrophages ($p = 0.02$). Regarding lepromatous leprosy, the findings suggest that keratinocytes actively participate in ENL, and the expression of MOR indirectly indicates that opioids may act as modulators in inflammation.

Keywords: μ opioid receptor; Cutaneous leishmaniasis; Sporotrichosis; Multibacillary leprosy; Erythema nodosum leprosum; Pain; Neurogenic inflammation.

LISTA DE FIGURAS DA TESE

Figura 1: Lesão típica de leishmaniose cutânea localizada no punho.....	14
Figura 2: Lesão de esporotricose forma fixa em braço.....	18
Figura 3: Via ascendente e descendente da dor.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX2	Ciclo-oxigenase- 2
DRG	Dorsal root ganglion
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELAM 1	Molécula de adesão endotelial 1 - Endothelial leukocyte adhesion molecule 1
ENH	Eritema nodoso hansênico
ENL	Erythema nodosum leprosum
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GRD	Gânglio da raiz dorsal
H&E	Hematoxilina e eosina (hematoxylin and eosin)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1 (intercellular adhesion molecule 1)
IFN γ	Gama interferon
IKB α	Complexo I κ B quinase α (Enzima inibidora do NF- κ B)
IKB β	Complexo I κ B quinase β (Enzima inibidora do NF- κ B)
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
IOC	Instituto Oswaldo cruz
LapClinVigiLeish	Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses
LC	Leishmaniose Cutânea
LL	Lepromatous leprosy – lepra lepromatosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana

MOR	Receptor opioide μ (μ opioid receptor)
NAPs	Nociceptores aferentes primários
NF- κ B	Fator nuclear kappa de células B ativadas
NGF	Fator de crescimento neural (Nerve growth factor)
PANs	Primary afferent nociceptors
PQT/OMS	Poliquimioterapia da Organização Mundialde Saúde
RJ	Rio de Janeiro
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TGF- β	Transforming growth factor beta
Th1	Células T helper 1
Th2	Células T helper 2
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1 (vascular cell adhesion molecule 1)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	13
1.2 Esporotricose	16
1.3 Hanseníase	18
1.4 A pele	22
1.5 Dor	22
1.6 Inflamação e dor	26
1.7 Opioides e receptores opioides	27
1.8 NF-κB	30
1.9 Reparo de feridas cutâneas	32
1.10 Inflamação neurogênica	34
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo principal	37
3.2 Objetivos secundários	37
4. MÉTODOS	38
4.1 ARTIGO 1:	39
4.2 ARTIGO 2:	46
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS	58
8. ANEXOS.....	69
Anexo I	69
Anexo II - Termo de Consentimento Geral	74
Anexo III - Termo de Compromisso e Responsabilidade	75
ANEXO IV - Parecer consbstantiado do CEP/INI	76

1. INTRODUÇÃO

Algumas enfermidades que se manifestam principalmente através de lesões cutâneas se caracterizam pelo encontro de granulomas no exame histopatológico, como a leishmaniose tegumentar americana, a esporotricose e a hanseníase.

A leishmaniose tegumentar americana e a esporotricose são doenças endêmicas no estado do Rio de Janeiro (RJ), com superposição das áreas afetadas. Ambas apresentam características epidemiológicas e aspectos clínicos similares, manifestando-se geralmente com úlceras no local de inoculação do agente infeccioso, o que torna necessário estabelecer diagnóstico diferencial entre elas (ANTONIO et al., 2017). Uma das características clínicas que auxilia na distinção destas condições é a presença ou ausência de dor nas úlceras (PESSÔA; BARRETO, 1948).

São também doenças de difícil diagnóstico diferencial do ponto de vista histopatológico por se manifestarem como úlceras cujo aspecto histológico é o granuloma, muitas vezes sem evidência do agente etiológico (QUINTELLA et al., 2012).

1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

No estado do Rio de Janeiro (RJ), a LTA é quase totalmente causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, cuja população parece ser geneticamente homogênea (BAPTISTA et al., 2009). O homem é hospedeiro acidental, adquirindo a doença pela picada da fêmea infectada do inseto vetor, denominado flebotômíneo. O quadro clínico da LTA depende das espécies infectantes e também da resposta imune do hospedeiro, principalmente a resposta imune mediada por células do tipo Th1 (SILVEIRA et al., 2009). As formas clínicas de LTA podem ser divididas em leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa ou cutaneomucosa (LM) (BRASIL, 2017). A LC pode-se apresentar clinicamente como forma cutânea localizada, forma cutânea disseminada ou forma cutânea difusa (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994). A maioria dos pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* apresenta forma cutânea localizada, com uma ou poucas lesões (PESSÔA; BARRETO, 1948).

A úlcera típica de LC é pouco dolorosa ou indolor e costuma localizar-se em áreas expostas à picada dos insetos vetores. Clinicamente, apresenta-se geralmente como lesão ulcerada arredondada ou ovalada, com base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; bordas bem delimitadas e infiltradas; fundo eritematoso com granulações grosseiras e com

escassa secreção (PESSÔA & BARRETO, 1948) (Figura 1). Lesões não tratadas podem apresentar cura espontânea após tempo variável, de meses a anos (Marsden *et al*, 1984). A cura espontânea quando o agente etiológico é *Leishmania (Viannia) braziliensis* pode ocorrer em 6,4% (COTA *et al.*, 2016).

Figura 1: Lesão típica de leishmaniose cutânea localizada no punho



Fonte: Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

Na LC, ocasionalmente, pode ocorrer lesão cutânea acompanhada de linfangite e gomas ao longo do trajeto linfático; neste caso, é conhecida como leishmaniose esporotricóide, devido à sua semelhança com a forma típica de esporotricose (CARVALHO *et al.*, 2017), ou ainda como leishmaniose linfática (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994). As formas de apresentação cutânea e mucocutânea/mucosa da LTA causada por *Leishmania (Viannia)* estão associadas a elevada intensidade de resposta imune celular. Estudos em humanos e em modelo murino têm

demonstrado um perfil misto Th1/Th2 com proeminente produção de interferon (IFN) γ , interleucina (IL)10, IL-13 e fator de necrose tumoral (TNF) α . A produção de fator transformador de crescimento (TGF)- β desempenha um papel importante no mecanismo de escape do parasito à destruição intracelular, diminuindo várias funções dos macrófagos (BARRAL-NETTO et al, 1992). Uma resposta imune com predomínio de citocinas de padrão T auxiliar (Th)1 favoreceria a evolução satisfatória da doença; por outro lado, o desequilíbrio entre as citocinas inflamatórias favoreceria a produção de citocinas do tipo Th2, que estaria relacionado a quadros crônicos, mais graves e com evolução desfavorável (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO; COUTINHO, 2014). Mecanismos reguladores devem desempenhar um papel muito importante no desenvolvimento da resposta imune, entretanto muito ainda tem que ser desvendado com relação à suscetibilidade individual e ao estabelecimento das formas clínicas e evolução da doença (RODRIGUEZ-PINTO et al., 2012). A LTA causada por espécies do subgênero *Viannia* é caracterizada por escassez de parasitos nas lesões cutâneas (MAGALHÃES et al., 1986) ou mucosas (DINIZ; COSTA; GONÇALVES, 2011), associada com uma resposta inflamatória robusta, e frequentemente segue um curso crônico. A identificação histológica de amastigotas nas lesões cutâneas é inversamente proporcional ao tempo de evolução da doença (GUTIERREZ et al., 1991).

A maioria dos casos de lesões ulceradas exhibe graus variáveis de hiperplasia escamosa, constituindo por vezes hiperplasia pseudoepiteliomatosa (QUINTELLA et al., 2011; QUINTELLA et al., 2012).

A pesquisa de parasitos nos cortes é positiva em torno de 63,7% dos casos na LC em artigo de Magalhães e colaboradores (1986) que classificaram os padrões histopatológicos encontrados na LC em cinco tipos, não excludentes: 1) Reação exsudativa celular (40,9%); 2) Reação exsudativa e necrótica (3,8%); 3) Reação exsudativa e necrótico-granulomatosa (26,1%); 4) Reação exsudativa e granulomatosa (22,9%); e 5) Reação exsudativa e tuberculoide (63%).

A ausência de dor espontânea nas lesões ulceradas de leishmaniose cutânea intriga os cientistas, por contraste com outras condições ulcerativas da pele nas quais a dor está geralmente presente e pode ser intensa, como na insuficiência venosa crônica. Infiltrado inflamatório perineural e mesmo intraneural de tipo granulomatoso foi descrito em pequena porcentagem de casos de LC do Velho Mundo (KUBBA et al., 1987), entretanto Schubach e colaboradores (2001) encontraram grande acometimento neural em lesões ativas de LC no Rio de Janeiro, nos casos em que foi possível evidenciar estruturas neurais. Uma detalhada avaliação histopatológica em nervos e correlação com a hipoestesia de lesões cutâneas em

leishmaniose experimental foi realizada por Cangussu e colaboradores (2013). Neste estudo, foram inoculados parasitos de *Leishmania major* em duas cepas de camundongo. Naqueles de pelagem escura C57BL/6, resistente à infecção, desenvolveu-se úlcera no local da injeção do parasito, tendendo à cura e à expressão predominante de citocinas pró-inflamatórias, com dor. Os camundongos de pelagem branca BALB/c, ao contrário, desenvolveram úlceras graves e com hipoalgesia prolongada. Apesar da densidade de fibras nervosas marcadas com PGP 9,5 (marcador neural) não ter alcançado diferença com significância estatística entre os grupos, houve significativa redução de IL-6 nas lesões no grupo BALB/c. O modelo murino é excelente para a análise da diferenciação Th1/Th2 em leishmaniose. A resistência à *Leishmania (L.) major* depende do desenvolvimento de uma resposta específica Th1, enquanto a diferenciação Th2 resulta em suscetibilidade a esse patógeno. A epiderme é a principal fonte de mediadores imunomoduladores que desencadeia a diferenciação Th1 ou Th2. Esta indução epidérmica foi significativamente mais forte nos ratos resistentes, especialmente quanto aos genes conhecidos por promover Th1. Os ratos com uma deficiência seletiva de IL-6 em células não-hematopoiéticas (que incluem queratinócitos) mostraram uma diferenciação Th2 e uma deterioração dramática da leishmaniose cutânea. Estes dados sugerem que a expressão epidérmica de citocinas pode ser um fator decisivo na geração de imunidade protetora Th1 e na resolução do processo inflamatório (EHRCHEN et al., 2010).

1.2 Esporotricose

A esporotricose é micose subaguda ou crônica causada por fungos do complexo *Sporothrix*, com lesões usualmente restritas à pele, tecido celular subcutâneo e vasos linfáticos adjacentes. Tem distribuição mundial, predominando em áreas tropicais e temperadas (BARROS et al., 2011). Acomete qualquer faixa etária; a diferença na distribuição dos casos por idade e gênero está fortemente associada à ocupação profissional e ao modo de transmissão sapronótico ou zoonótico (SCHUBACH et al., 2008; BARROS et al., 2008; BARROS et al., 2011; TAKENAKA et al., 2014; OYARCE et al., 2016).

A forma clínica depende em parte do tamanho do inóculo, da profundidade da inoculação, da virulência e tolerância térmica da cepa e do estado imune do hospedeiro. As formas restritas à pele geralmente sucedem inoculação traumática e podem permanecer localizadas (forma fixa) ou se estender ao longo do trajeto linfático (forma linfocutânea); mais raramente, disseminação hemática do fungo caracteriza a forma cutânea disseminada (BARROS et al., 2011).

Na forma linfocutânea, a lesão primária surge geralmente nas extremidades superiores, face ou membros inferiores, locais mais expostos a traumas, iniciando-se geralmente com lesão eritemato-papulosa ou pustulosa, com evolução para nódulo ou placa e posteriormente úlcera com linfangite e lesões secundárias semelhantes à primeira (nódulos ou gomas) no trajeto de vasos linfáticos, e ocorre em mais de 70% dos casos (RAMOS-E-SILVA et al., 2007; BARROS et al., 2011).

A forma fixa é menos frequente (cerca de 20% dos casos) e se caracteriza por lesão única no local da inoculação, frequentemente ulcerada e com bordas infiltradas (Figura 2); pode apresentar-se como lesão vegetante, verrucosa, tuberosa, ou placa infiltrada, podendo haver pápulas satélites. Caracteristicamente, não há envolvimento linfático (BARROS et al., 2011).

A forma cutânea disseminada (múltiplas lesões em áreas não contíguas da pele, sem lesões extracutâneas, acometendo mais de dois segmentos) geralmente está associada a imunossupressão (CARVALHO et al., 2002).

A forma extracutânea, com acometimento de outros órgãos, também está associada a imunossupressão, particularmente à infecção por HIV (FREITAS et al., 2015).

Figura 2: Lesão de esporotricose forma fixa em braço.



Fonte: Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

O exame histopatológico de tecidos permite a visualização de leveduras pelas técnicas da prata metenamina de Grocott ou do ácido periódico de Schiff (PAS) em cerca de 35% dos casos (QUINTELLA et al., 2011). A esporotricose se caracteriza histologicamente por reação inflamatória mista, supurativa e granulomatosa, na derme e no tecido subcutâneo, frequentemente acompanhada por microabscessos e fibrose (BULPITT; WEEDON, 1978). Nos casos da presente epidemia no estado do Rio de Janeiro, observa-se granuloma imaturo (malformado) em aproximadamente 60% dos casos, ou maduro (bem formado) em torno de 40%. Em 20% dos casos há hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Os granulomas geralmente são supurativos e exibem necrose central, apresentando polimorfonucleares e plasmócitos em torno de 80%, com fibrose em 55%, hemorragia em torno de 70% e proliferação vascular secundária em 85% (QUINTELLA et al., 2011).

O diagnóstico definitivo de esporotricose obtém-se por isolamento de fungos do complexo *Sporothrix* em meios de cultura, como agar Sabouraud com cloranfenicol ou agar micobiótico. O exame direto de espécimes clínicos (escama, secreção, etc.) provenientes de lesões em humanos não apresenta geralmente resultado satisfatório, pela escassez de fungos (BARROS et al., 2011).

1.3 Hanseníase

A hanseníase é doença crônica, infectocontagiosa, causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo com alta infectividade, no entanto baixa patogenicidade. Estas propriedades ocorrem em função de suas características intrínsecas, da relação com o hospedeiro e do grau de endemicidade do meio, entre outros aspectos. Em 2014, havia no Brasil 25.730 casos em registro ativo, sendo 44% com baciloscopia negativa. O número de pacientes no RJ representa 3,4% dos casos nacionais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A classificação operacional da OMS é Paucibacilar – Hanseníase Tuberculóide ou Indeterminada (doença localizada em uma região anatômica e/ou um tronco nervoso comprometido) com menos de 5 lesões cutâneas ou Multibacilar (MB) – Hanseníase doença disseminada em várias regiões anatômicas e/ou mais de um tronco nervoso comprometido) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A hanseníase tuberculóide (TT) é uma forma paucibacilar. Caracteriza-se por lesão única, ou poucas, assimetricamente distribuídas pelo tegumento. Apresenta-se como mácula hipocrômica ou eritematosa delimitada por micropápulas, ou como lesão eritematosa, difusamente infiltrada ou com tendência à cura central, com limites externos bem definidos. As

lesões são hipoestésicas ou anestésicas, com superfície cutânea seca, hipodrótica, e diminuição ou ausência de pelos. Envolvimento de troncos nervosos pode ocorrer em pequeno número, usualmente próximo às lesões cutâneas. A baciloscopia é negativa. Na lesão cutânea o exame histopatológico apresenta comprometimento inflamatório granulomatoso dos filetes nervosos, e mesmo quando estes estão ausentes, observa-se comprometimento de anexos cutâneos. A forma polar TT está relacionada com o perfil de citocinas Th1 (principalmente IL-2 e IL-12) e a forma polar de hanseníase na forma lepromatosa (LL) está relacionada com o perfil de citocinas Th2 (principalmente IL-4 e IL-10). Entre esses padrões clínicos, a hanseníase borderline mostra expressão variada de citocinas (PINHEIRO et al., 2018).

Ridley & Jopling (1966) classificaram a hanseníase segundo o espectro imunológico. Para fins de classificação, cinco formas revelaram-se suficientes e adequados. Elas são designadas como tuberculoide tuberculoide (TT), borderline tuberculoide (BT), borderline borderline (BB), borderline lepromatoso (BL) e lepromatoso lepromatoso (LL).

Histopatologicamente, o espectro das formas clínicas é:

TT: apresenta-se com agrupamento de células epitelioides, muitas vezes com células gigantes de Langhans, circundadas por halos de linfócitos e estendendo-se até a epiderme. Apresenta granulomas dentro dos nervos e muitas vezes estes nervos estão ocupados pelo granuloma tornando-se irreconhecíveis.

BT: células epitelioides agrupadas ou acompanhadas de células gigantes tipo Langhans ou ambos. Há uma estreita zona clara subepidérmica e o infiltrado pode tocar focalmente a epiderme. Os nervos frequentemente são discerníveis, com infiltrado perineural com invasão do endoneuro e perineuro.

BB: células epitelioides, ausência de células gigantes tipo Langhans, número variável de linfócitos e infiltração de nervos.

BL: histiócitos mostrando uma tendência ao desenvolvimento de célula epitelióide, histiócitos carregados com bacilos e com degeneração espumosa, mas sem grandes globias. Grupamentos de linfócitos presentes com infiltração de perineuro com aspecto de bulbo de cebola.

LL: normalmente mostram degeneração espumosa e formação de globias, com comprometimento de anexos cutâneos. (RIDLEY; JOPLING, 1962).

Há dois tipos de reações hansênicas: tipo 1 ou reação reversa (RR) e tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH).

REAÇÃO TIPO 1 OU REAÇÃO REVERSA (RR): O episódio da RR envolve principalmente mecanismos da imunidade mediada por células. Estas reações ocorrem com

maior frequência nas formas BL. O processo inflamatório da RR envolve, principalmente, a pele e nervos invadidos pelo bacilo envolvidos no processo inflamatório imune em resposta à invasão tecidual. Há exuberância e predomínio da resposta inflamatória granulomatosa, ou reação imunológica Th1, podendo resultar na formação de abscesso neural e úlceras cutâneas. As lesões cutâneas preexistentes tornam-se mais eritematosas, intumescidas, edematosas e infiltradas. As máculas tornam-se placas elevadas e os limites das lesões tornam-se mais evidentes e definidos. Evoluem com descamação e, por vezes, sobrevém ulceração. Novas lesões assemelhando-se às demais surgem em áreas adjacentes. Concomitante a estas alterações, pode ocorrer hiperestesia ou acentuação da parestesia sobre as lesões cutâneas.

REAÇÃO TIPO 2 OU ERITEMA NODOSO HANSÊNICO (ENH): A reação tipo 2 é uma reação inflamatória aguda, sistêmica, que envolve a formação de imunocomplexos que circulam pelo sangue periférico, e tem como manifestação clínica mais frequente o eritema nodoso hansênico. Acomete pacientes multibacilares, agravando o quadro relacionado à hanseníase, sendo responsável por morbidade considerável, particularmente o eritema nodoso recorrente. O episódio de ENH é desencadeado pelo depósito de complexos imunes nos tecidos, ativação de complemento, desenvolvimento de inflamação local, e migração de polimorfos nucleares para o sítio de resposta. Macrófagos e células T são ativados e os níveis de TNF α circulante se elevam durante os episódios de ENL. A intensidade da reação varia entre casos leves de ENH com poucas lesões cutâneas com pequena intensidade dolorosa, sem comprometimento do estado geral, a casos mais graves com formação de lesões vesicobolhosas e pustulosas, lesões ulceradas e necróticas, concomitante com manifestações sistêmicas. Previamente à introdução da poliquimioterapia da Organização Mundial de Saúde (PQT/OMS), cerca de 50% dos pacientes lepromatosos (LL) e 25% a 30% dos pacientes BL eram afetados por este padrão de reação. Estudos controlados no Brasil mostraram que o ENH é um tipo frequente de reação entre os multibacilares com esquema PQT/OMS, entre 25% a 30%. Nesta reação, a pele aparentemente normal é acometida pelo aparecimento súbito de pápulas, nódulos e placas. As lesões são dolorosas e tensas ao toque, de coloração rósea a eritemato-violácea, evoluem com descamação central e podem se tornar hemorrágicas, vesicobolhosas, pustulosas e ulcerativas, caracterizando o quadro de eritema nodoso necrosante. O surgimento de lesões obedece a uma distribuição simétrica, bilateral e difusa que atinge a face, tronco e membros, preferencialmente a superfície extensora das extremidades. As lesões cutâneas perduram por sete a dez dias e evoluem em surtos, durante os quais lesões antigas coexistem com outras mais recentes. A eclosão das lesões pode evoluir de modo intermitente ou contínuo, caracterizando quadros crônicos e recorrentes que podem persistir por meses a anos. Em casos leves, as lesões

cutâneas são, em geral, em pequeno número, pouco sintomáticas e não estão associadas a comprometimento sistêmico importante. Nos casos moderados a graves, a extensão das manifestações cutâneas e sistêmicas é mais acentuada.

Revisão sistemática da incidência de ENH resultou em 65 estudos, predominantemente da Índia (24) e Brasil (9), demonstrando que 15,4% dos casos LL desenvolveram ENH. Vários episódios de ENH ocorreram em 39 a 77% dos pacientes de ENH, com uma média de 2,6. Alguns estudos encontraram um pico de incidência de ENH no primeiro ano de tratamento, outros durante o segundo e terceiro ano após o início da PQT. O principal fator de risco para o ENH é um alto índice bacteriológico (VOOREND; POST, 2013).

O ENH é uma complicação inflamatória dolorosa, ocorrendo em 50% dos pacientes LL e 5 – 10% dos pacientes com forma borderline lepromatosa (BL), particularmente aqueles com um índice bacteriano acima de 4 (WALKER et al., 2015).

Histologicamente, no ENH as lesões caracterizam-se por infiltração perivascular intensa com leucócitos polimorfonucleares. As paredes vasculares podem mostrar necrose fibrinoide e hiperplasia do seu endotélio. No interstício observam-se macrófagos vacuolados com presença de bacilos íntegros ou fragmentados e poeira bacilar e infiltração de polimorfonucleares com presença de edema. Pacientes com hanseníase lepromatosa mostra uma densidade de células de Langerhans bastante diminuída, no entanto aqueles com reação do tipo 2 apresentam um aumento da quantidade de célula de Langerhans, reforçando o conceito de imunidade Th1 (MATHUR et al., 1983).

Pacientes com eritema nodoso hansênico têm um aumento da razão entre células T-auxiliares:T-supressoras. Como resultado, há um aumento de linfócitos Th1 e redução de células supressoras, especialmente do subtipo Th2, que estimula a diferenciação de plasmócitos e produção de imunoglobulinas. A presença de anticorpos e antígenos circulantes abundantes nos pacientes com ENH permitem a formação de complexos imunes de diferentes tamanhos (VÁZQUEZ-BOTET; SÁNCHEZ, 1987).

Em teoria, o complexo imune seria o estímulo ao processo inflamatório. O endotélio, por sua vez estimulado, expressa E-selectina (ELAM 1) e produz TNF, IL-1 e outras quimiocinas inflamatórias. O aumento da permeabilidade capilar induz diapedese e infiltração de neutrófilos, favorecendo necrose fibrinoide na parede vascular. Esta vasculite necrosante é um critério diagnóstico de reação do tipo 2.

A produção de TNF- α in vitro por neutrófilos foi inibida por talidomida em 3 e 6 h após estimulação com LPS. Isto suporta a função de neutrófilos como células efetoras, ativamente

produzindo citocinas pró-inflamatórias e não só como células migratórias efectoras de fagocitose (OLIVEIRA et al., 1999).

1.4 A pele

A pele é densamente innervada por terminações nervosas sensoriais aferentes primárias emitidas a partir do gânglio da raiz dorsal (GRD). Esta innervação cutânea desempenha um papel crucial na função sensorial aferente (como temperatura, toque, dor) e função eferente. A função sensorial aferente inclui a liberação de neuropeptídeos após a ativação, bem como a expressão de receptores opioides. Além disso, as terminações nervosas livres estão em estreito contato com as células da pele (fibroblastos, queratinócitos), ou com estruturas dérmicas como vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas ou folículos pilosos. Por todas estas razões, a innervação cutânea desempenha um papel-chave na manutenção da homeostase cutânea, e existem evidências crescentes de que participa de numerosos processos fisiológicos tais como o reparo tecidual (MISERY et al., 1997).

Fatores exógenos (como calor, arranhões, irritantes primários, alérgenos, agentes microbiológicos, luz ultravioleta) ou endógenos (mudanças de pH, citocinas, cininas, histamina, proteases, neurotransmissores, hormônios, "stress") podem direta ou indiretamente estimular terminações nervosas de neurônios aferentes primários, que transmitem os estímulos ao Sistema Nervoso Central. Terminações nervosas periféricas estimulam fibras nervosas aferentes na derme e epiderme, resultando na liberação de neuropeptídios que induzem respostas vasculares ("tríplice reação de Lewis," eritema por vasodilatação e edema por extravasamento de plasma), e regulação de liberação de mediadores químicos (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento) por células de Langerhans e queratinócitos. (MISERY et al., 1997).

1.5 Dor

A palavra "dor", na Língua Portuguesa, vem do latim: *dolere*, que significa sofrimento. Os fisiologistas distinguem entre dor e nocicepção, onde a nocicepção se refere aos sinais que chegam ao sistema nervoso central (SNC) resultantes da ativação dos receptores sensoriais especializados, chamados nociceptores, que fornecem informações sobre a lesão tecidual. A dor é uma experiência emocional desagradável que acompanha a nocicepção.

Nociceptores ativados que estão em terminais de fibras sensitivas cutâneas despolarizam axônios que formam nervos periféricos sensitivos, e que são na realidade uma combinação

composta de feixes nervosos individuais, delimitados por uma bainha de tecido conectivo frouxo. A capacidade de perceber a dor é um mecanismo de sobrevivência, servindo de alerta para a presença de uma lesão tecidual real ou potencial. Em determinadas situações, sua intensidade e duração não mantêm uma relação de proporcionalidade com o estímulo agressor. Dor crônica, resultante da persistência de estímulos nociceptivos ou disfunções do sistema nervoso, não é uma versão prolongada de dor aguda, e cada tipo é conduzido por fibras neurais diferentes. A experiência dolorosa é modulada por mecanismos de natureza multidimensional (fenômenos neurofisiológicos, psicológicos, cognitivos, comportamentais, sociais). Neurofisiologicamente, dor crônica apresenta-se como uma hiperexcitabilidade dos neurônios no corno dorsal da medula espinhal. Estes neurônios diminuem o limiar de ativação e ampliam seus campos receptivos, o que se manifesta como hiperalgesia: aumento da sensibilidade à dor causada por um estímulo que normalmente provoca dor; alodinia (dor causada por um estímulo que normalmente não provoca dor); e hiperpatia (sensibilidade excessiva à dor, aos estímulos dolorosos, podendo permanecer mesmo após a interrupção desses estímulos). Vários neuromoduladores e transmissores, como substância P, neurocinina A, peptídeos relacionados ao gene da calcitonina, galanina e aminoácidos excitatórios participam neste fenômeno de hiperexcitabilidade central (LAWSON, 2002).

Os neurônios primários aferentes sensoriais são responsáveis pelo processamento de informações como temperatura, toque, propriocepção e dor. Os corpos celulares destes neurônios são encontrados no gânglio da raiz dorsal (GRD). Os que transmitem informação aferente sobre estímulos potencialmente prejudiciais que levam à percepção da dor são conhecidos como "nociceptores". Estes neurônios sensoriais nociceptivos são subdivididos em dois grupos: (1) rápido (fibras A mielinizadas), que transmitem o estímulo inicial de nocicepção (sensitivo ou térmico); e (2) lento (fibras C, amielínicas), que transmitem uma sensação nociceptiva menos intensa. Possuem conexão periférica que inerva músculos, tendões, vísceras, pele e algumas mucosas, e um axônio central que penetra no SNC. A evidência que sustenta a ideia de que os sinais das fibras C e A δ - β são sensações de dor distintas provém de condições experimentais, estimulação elétrica e bloqueio de nervo, onde as atividades das fibras A e C são estudadas isoladamente. Quando é feita a estimulação nas fibras A uma sensação de dor acentuada em picada é descrita; estimulação nas fibras C leva a uma sensação fraca do tipo queimação dolorida (LAMONT e TRANQUILLI, 2000).

Quatro classes de nociceptores foram descritos: mecânicos, térmicos, polimodais e silenciosos. Os nociceptores mecânicos respondem a pressão intensa, enquanto os nociceptores térmicos respondem às temperaturas extremas, quentes (> 45°C) ou frias (< 5°C), e possuem

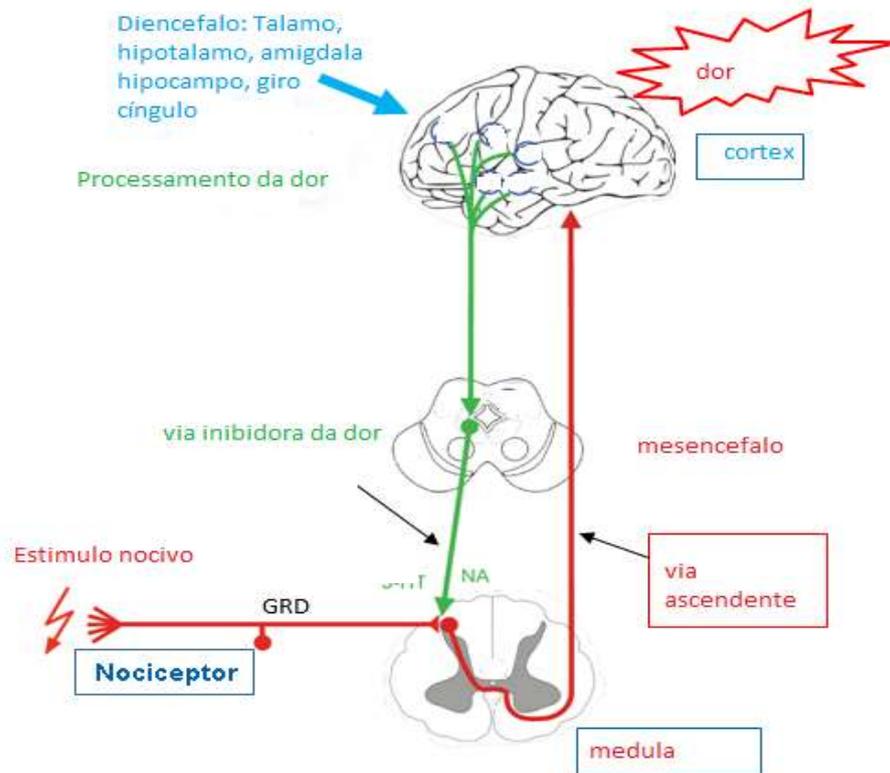
fibras A mielinizadas que conduzem impulsos na velocidade de 3 metros por segundo (m/s) a 40 m/s. Coletivamente, esses dois tipos de nociceptores A δ - β são chamados de nociceptores mecano-térmicos. Os nociceptores polimodais respondem aos estímulos nocivos de natureza mecânica, térmica e química, e possuem pequenas fibras C amielinizadas que conduzem impulsos em velocidade menor, de 3 m/s. Os nociceptores silenciosos são ativados por estímulos químicos e mediadores inflamatórios, e respondem a estímulos mecânicos e térmicos somente depois de terem sido ativados. Estes nociceptores também possuem pequenas fibras C amielinizadas que conduzem impulsos numa velocidade menor que 3 m/s. Os nociceptores que respondem às temperaturas nocivas podem ser divididos em: unimodais, que são ativados por um estímulo exclusivamente térmico; e os polimodais, que detectam estímulos dolorosos químicos, mecânicos e térmicos (LAWSON, 2002).

Estudos mostram que os agonistas para o receptor opioide μ periférico (MOR) exercem um poderoso efeito analgésico quando aplicados diretamente à medula espinhal. Este efeito tem sido replicado em humanos e tem levado ao uso clínico difundido de opioides intratecal e epidural para o manejo da dor aguda e crônica. Os terminais centrais dos nociceptores aferentes primários (NAPs) localizam-se nas lâminas superficiais do corno dorsal, especialmente na lâmina II. A substância gelatinosa lâmina II contém interneurônios locais que retransmitem a mensagem nociceptiva proveniente dos NAPs para os neurônios das vias ascendentes da dor. O mecanismo deste efeito analgésico depende das ações pré-sináptica e pós-sináptica de agonistas MOR no corno dorsal superficial. Agonistas de MOR inibem a liberação de substância P de NAPs e isso provavelmente contribui para sua ação analgésica. Além deste efeito pré-sináptico, agonistas de MOR hiperpolarizam fortemente os neurônios da lâmina II, incluindo aqueles com feixe axonal para os neurônios de projeção da dor em lâmina I e corno dorsal profundo. MORs estão presentes nos terminais centrais dos nociceptores aferentes primários e em interneurônios na lâmina II do corno dorsal. Ambas as ações de condução podem bloquear a transmissão da mensagem de neurônios de projeção da dor nociceptiva localizada na lâmina I (FIELDS, 2011).

O corpo da célula aferente primária está localizado no GRD. De maneira sucinta, as ações da coluna vertebral dos agonistas MOR concentram-se na lâmina II do corno dorsal. Neste local eles inibem a liberação do neurotransmissor excitatório glutamato e de neuropeptídeos, incluindo a substância P de NAPs, para os neurônios nociceptivos do corno dorsal. Portanto, ações de MOR na medula espinhal incluem claramente o bloqueio da transmissão da mensagem nociceptiva. Além dos neurônios de transmissão de dor central e periférica, agonistas de MOR produzem analgesia agindo sobre um circuito de modulação de

dor que inclui regiões do córtex frontal, hipotálamo, amígdala e mesencéfalo (FIELDS, 2011). (figura3).

Figura 3: Via ascendente e descendente da dor



Legenda: Estímulo deflagrado se direciona ao Gânglio da Raiz dorsal (GRD), se direcionando ao corno posterior da medula para Lâmina gelatinosa 1 e 2 e posteriormente faz o cruzamento contralateral fazendo a ascensão ao córtex e diencefalo (em vermelho). Posteriormente modula-se por via inibidora noradrenérgica e por serotonina do mesencéfalo ao corno posterior da medula, quando o neurônio do GRD sofre despolarização, inibindo o arco álgico.

Fonte: Adaptado de Andrea Kreuzsch e Stefanie Krafft

Estudos em animais documentam um papel crucial para citocinas na sinalização de eventos subjacentes à inflamação e dor associada com lesão tecidual. A exploração de citocinas em bioensaio humano constitui ferramenta relevante para o estudo da patologia e farmacologia da dor crônica e inflamatória (ANGST et al., 2008).

As citocinas são importantes na dor, agindo através de diferentes mecanismos. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão. Ligam-se a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. As citocinas influenciam a atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência das células imunes, podendo aumentar (pró-

inflamatórias, Th1) ou atenuar (anti-inflamatórias, Th2) a resposta inflamatória, dependendo do microambiente. Dentre as citocinas pró-inflamatórias temos IL-1, IL-2, IL-6, IL-17 e TNF. As citocinas anti-inflamatórias incluem IL-4, 10, 13 e o TGF β (SOMMER et al., 2010).

Evidências acumuladas suportam um papel essencial da IL-6 (membro da família de citocinas neuropoiéticas) no desenvolvimento, diferenciação, regeneração e degeneração dos neurônios no SNC e periférico. Locais fundamentais de síntese de IL-6 no sistema nervoso são os neurônios e células gliais. IL-6 pode ser encontrada em pele normal ou na inflamação cutânea (GADIANT et al., 1997). Também se demonstrou que IL-12 e IL-18 induzem hipernocicepção inflamatória. Por outro lado, existem citocinas tais como IL-4, IL-10 e IL-13 e antagonistas de receptores IL-1 inibindo a produção de citocinas hipernociceptivas (VERRI et al., 2006).

Os efeitos algícos de citocinas pró-inflamatórias são às vezes indiretos, podendo induzir a expressão de agentes que fazem sensibilização dos nociceptores. Na inflamação e degeneração Walleriana (oriunda do corte ou esmagamento da fibra nervosa), a produção de citocinas está organizada em sequência com TNF (MOALEM et al., 2006).

1.6 Inflamação e dor

Inflamação e dor secundária à inflamação constituem uma série de eventos altamente coordenados como resposta aos estímulos prejudiciais, tais como agentes infecciosos ou físicos. Dor inflamatória periférica aguda é associada com a infiltração local de células inflamatórias. O sistema imune, que aqui denominamos imunócitos, após o dano tecidual, leva a uma resposta inflamatória através da liberação de mediadores químicos denominados citocinas e quimiocinas. Estas alterações inflamatórias, que levam conseqüentemente à vasodilatação e à migração de imunócitos locais, atraem também mais leucócitos para o sítio inflamatório, que amplificam ainda mais o processo de migração e alteração do microambiente tecidual. Mediadores químicos inflamatórios são liberados levando a acidificação tecidual, e induzem a ativação de receptores nociceptivos em terminações de neurônios aferentes primários, o que estimula a sensação de dor e causa hiperalgesia. Opioides endógenos como as endorfinas e encefalinas agem principalmente em receptores opioides μ (MOR) e receptores opioides δ (DOR), que são sintetizados a fim de modular mecanismos de dor e processos inflamatórios. Eles medeiam a analgesia em resposta a estímulos dolorosos por ligação a receptores de opioides no nervo sensitivo cutâneo (HUA; CABOT, 2010).

Quando o processo inflamatório agudo não é resolvido, ocorre uma inflamação crônica. Muitos tipos de imunócitos são recrutados e liberam várias interleucinas e quimiocinas que

podem contribuir para a cura da lesão de forma orquestrada. A cascata de citocinas resulta em ativação de prostanoídes dependente de COX-2 e na liberação de catecolaminas das fibras simpáticas (SOMMER, 2004). Algumas delas (como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) estão relacionados com o limiar de dor. Por outro lado, peptídeos opioides acoplados aos nociceptores tornam o axônio menos sensível à excitação e, assim, dificultam a ação de vários mediadores excitatórios que causam dor. Os peptídeos opioides não se vinculam exclusivamente a um único receptor opioide; em vez disso, apresentam afinidade para vários receptores opioides, incluindo μ , δ e κ (HUA; CABOT, 2010). No entanto, há ampla distribuição dos receptores opioides em tecidos e órgãos fora do sistema nervoso central (SNC), em fibras nervosas sensíveis (onde o número de fibras A δ é maior do que a das fibras C) e nervos autônomos. Os opioides produzidos por células do sistema imunológico e queratinócitos são capazes de exercer efeitos adicionais no sistema nervoso periférico (SNP), tais como a imunomodulação em inflamações cutâneas. Todos os opioides endógenos têm uma sequência de encefalina no N-terminal (Tyr-Gly-Gly-Phe-/Leu), com muitos peptídeos contendo uma extensão C-terminal, que modula a seletividade do receptor e susceptibilidade à degradação por proteases extracelulares. O peptídeo opioide é facilmente degradado no meio extracelular que é rico em prótons e células necróticas que liberam proteases, ou por agentes físicos como calor, por exemplo. (BEREZNIUK e FRICKER, 2011).

Muito se discute sobre o papel de opioides e receptores opioides na inflamação. Em vários modelos de inflamação aguda, MOR é efetivo em reduzir substância P e vasodilatação, edema e extravasamento de plasma para o interstício, portanto com efeito anti-inflamatório (STEIN, 2013). Condições relacionadas com aumento da endomorfina-2 podem desempenhar um papel importante e abrangente na reação imune, o que ajuda a explicar que receptores opioides e opioides poderiam exercer uma função tanto pró quanto anti-inflamatória (AZUMA et al., 2002).

1.7 Opioides e receptores opioides

Os receptores opioides são sintetizados no GRD; os receptores μ , δ e κ são transportados tanto centralmente como periféricamente. Os receptores opioides ocorrem principalmente nas terminações dos aferentes primários, e pós-simpaticamente nos neurônios do corno dorsal da medula espinhal. Inibem a excitação dos neurônios da medula espinhal interferindo na liberação dos neurotransmissores excitatórios pelos aferentes primários. Os opioides agem pré-sinápticamente nos receptores μ e δ das terminações nervosas sensitivas, inibem as correntes de

Ca^{++} dependentes de voltagem e suprimem a liberação de neurotransmissores, incluindo o glutamato e a Substância P. Agem também em sítios pós-sinápticos e hiperpolarizam neurônios do corno posterior da medula espinhal. Quando os receptores opioides, especialmente os μ e δ , são acionados, ocorre hiperpolarização das terminações das fibras C, devido à abertura dos canais de K^+ e à redução da sua excitabilidade; ocorre redução na liberação de neurotransmissores excitatórios e a transferência dos estímulos sensoriais é reduzida. Na medula espinhal, sinais nociceptivos são inibidos pela liberação de opioides endógenos ou ácido gama-aminobutírico (GABA) de interneurônios, por ativação pré-sináptica por opioides e/ou receptores GABA nos terminais do nociceptor central para reduzir a liberação de transmissor excitatório. A abertura pós-sináptica de canais de K^+ por opioides ou ácido gama amino butírico GABA evoca hiperpolarização por potenciais inibitórios em neurônios do corno dorsal. Vias de excitação noradrenérgicas, serotoninérgicas e opioides inibitórias descendentes também se tornam ativadas. Regiões-chave do cérebro para percepção da dor e regulação da mesma são a região periaquedutal e a medula rostral ventromedial, que se projetam para o corno dorsal da medula espinhal inibindo a nocicepção (STEIN, 2018).

O fator de crescimento neural (NGF) regula o fenótipo do neurônio sensitivo pela expressão de canais iônicos e receptores, contribuindo para a dor. A ação do opioide contrária à nocicepção periférica é dependente da eficácia, acoplamento e expressão de receptores opioides (MOR) no neurônio sensitivo (MOUSA et al., 2007).

MOR está relacionado com peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e com os receptores de NGF no GRD de rato. O NGF aumenta o transporte e expressão de MOR no GRD. O aumento de MOR no GRD foi seguido por transporte de MOR no axônio para terminais de nervo periférico, e subsequente aumento de MOR em fibras cutâneas nervosas em lesão inflamatória induzida na pata do rato. Efeitos ocasionados por aumento de MOR pela indução por NGF ocorrem no GRD através das fibras de nervo periférico com potenciação da antinocicepção e estes efeitos são revogados pela neutralização de NGF (MOUSA et al., 2007).

Opioides foram originalmente descobertos por causa de sua capacidade de induzir a analgesia. Adicionalmente, os opiáceos regulam a função das células envolvidas na resposta imune. A regulação de citocinas e a expressão do receptor de citocinas é um componente fundamental da atividade imunomodulatória dos opiáceos. Receptores opioides são expressos por neurônios centrais e periféricos (μ , δ e κ) e as células inflamatórias produtoras de opioides também apresentam estes receptores na membrana celular. Finley e colaboradores (2008) analisaram a regulação de citocinas e expressão do receptor de citocinas por agonistas para os três tipos principais de receptores opioides μ , κ e δ , respectivamente denominados como MOR,

KOR e DOR, e nociceptina, o agonista natural para o receptor FQ/nociceptina orphanina. Embora os receptores opioides compartilhem um alto grau de sequências homólogas, o papel dos receptores de opioides κ e dos receptores opioides μ é diverso. Foi sugerido que ativação do KOR induz uma resposta anti-inflamatória por supressão do receptor de citocinas, enquanto a ativação de MOR favorece uma atividade pro-inflamatória. (FINLEY et al., 2008).

O estímulo doloroso inflamatório nos tecidos periféricos é considerado um gatilho para a regulação de receptores opioides em neurônios sensoriais adultos. A resposta inflamatória é acompanhada pela proliferação de receptores opioides nos terminais sensoriais periféricos, através da ruptura de uma barreira perineural que facilita o acesso dessas substâncias aos seus receptores. O pH baixo pode aumentar o efeito agonista por interferir na interação dos receptores opioides com as proteínas G responsáveis pela sinalização de opioides endógenos ou fármacos opioides. Durante a inflamação, há regulação para mais de receptores opioides no corno dorsal da medula espinhal e, conseqüentemente, há um aumento do transporte axonal de receptores para a periferia, estimulado por citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) e pelo NGF provenientes do local da inflamação. As citocinas, então, regulam o crescimento e a proliferação das células gliais, modulam a atividade dos peptídeos opioides endógenos e ativam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Todo esse processo resulta em uma alta densidade de receptores opioides nos terminais nervosos periféricos, que contribuem para a eficácia antinociceptiva dos opioides nos tecidos inflamados. Nos estágios iniciais (primeiras horas) da resposta inflamatória, há uma contribuição tanto dos receptores opioides centrais quanto dos periféricos; entretanto, nos estágios mais tardios (vários dias), a analgesia endógena é mediada predominantemente por receptores periféricos, tornando-se esta, então, mais influente com a duração e intensidade da inflamação (MOALEM et al., 2006).

A descoberta de receptores opioides em neurônios sensoriais gerou a pesquisa de peptídeos ligantes endógenos nos tecidos nos quais ocorrem processos inflamatórios. Atualmente se conhecem três famílias desses peptídeos, que são expressos e regulados em granulócitos, macrófagos e linfócitos, tanto em roedores quanto em humanos. Cada família se origina de um gene distinto e de um dos três precursores proteicos – a proopiomelanocortina (POMC), a proencefalina (PENK) e a prodinorfina – em que são processados a endorfina, a encefalina e a dinorfina, respectivamente. Esses peptídeos exibem diferentes afinidades pelos receptores opioides: μ (endorfina e encefalina), δ (encefalina e β -endorfina) e κ (dinorfina) e são detectados em várias células imunes. Tornou-se claro a partir de modelos animais que, concomitantemente com os efeitos pró-inflamatórios e proálgicos, através de uma miríade de mediadores liberados nos tecidos lesados, há mecanismos endógenos que contrarregulam a dor

e a inflamação. Consistentemente, em experimentos com câncer ósseo, bem como em humanos submetidos a cirurgias de joelho, a injeção local de antagonistas de opioides nos locais inflamados causou exacerbação do quadro algico. Isso indica fortemente que peptídeos opioides endógenos são continuamente liberados e têm uma ação de combate à dor. Em estudos com ratos, demonstrou-se que leucócitos que são atraídos e que migram em direção ao local de lesão tecidual contêm opioides endógenos. Há uma coexpressão de receptores de quimiocinas e de bradicinina. Quando há depleção de granulócitos, imunossupressão ou bloqueio de quimiocinas e neurocininas, há uma redução relevante da antinocicepção (BUSCH-DIENSTFERTIG; STEIN, 2010).

Ao longo dos anos, vários diferentes ligantes opioides foram encontrados na pele humana, tais como beta-endorfina (WINTZEN et al., 2001), encefalinas (TACHIBANA; NAWA, 2005) e dinorfinas (TOMINAGA, 2007). Bigliardi-Qi et al. (1999) relataram pela primeira vez a presença de MOR em células de pele humana. Durante os anos seguintes, a existência de MOR foi confirmada em fibras sensitivas cutâneas (STÄNDER et al., 2002). Bigliardi et al. (2009) demonstraram por reação em cadeia da polimerase em tempo real a expressão de MOR em células de pele derivadas da ectoderme (queratinócitos e melanócitos), que por sua vez é maior do que a expressão de DOR. Por outro lado, fibroblastos derivados da mesoderme expressam níveis mais elevados de DOR do que de MOR. A expressão distinta dos receptores opioides em várias células de pele sugere diferentes papéis para estes sistemas de receptores na fisiologia e patologia da pele. Funcionalmente, DOR e, em menor grau, MOR, estão envolvidos na diferenciação da pele e na homeostasia, e modulam intensamente a cicatrização de feridas (BIGLIARDI et al. 2003, 2009). A ativação de MOR resulta em um aumento na atividade dos fatores de transcrição do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B), responsável por transcrição de várias citocinas inflamatórias.

1.8 NF- κ B

O fator de transcrição NF- κ B é conservado na evolução e com ação descrita em diversas células que compõem os organismos complexos. Entre os estímulos regulados pelo NF- κ B estão os neurotransmissores, neurotrofinas, proteínas neurotóxicas, citocinas (IL-1 e TNF), glicocorticoides, produtos de reações de enzimas como a óxido nítrico sintase induzível e a cicloxigenase tipo 2. Independente do estímulo, parece haver participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do

NF- κ B. Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra a translocação. O I κ B, assim como as subunidades que compõe o NF- κ B, pertence à família de proteínas Rel F (família de oncogenes retrovirais). Estudos de biologia molecular clonaram genes que codificam oito proteínas da família NF- κ B e sete da família I κ B. Os subtipos mais estudados de proteínas inibitórias são o I κ Ba e o I κ Bb, sendo o papel do I κ Ba melhor caracterizado. A regulação da ativação do I κ Ba e do I κ Bb é diferente, o que aumenta a complexidade da ativação desse fator nuclear. Vários estímulos levam à fosforilação do I κ B, que é fundamental para sua degradação. A proteína I κ B fosforilada recebe a adição de ubiquitina, pela ação da ubiquitina ligase, sendo em seguida degradada pelo complexo proteossoma 26S. Isso resulta na liberação do NF- κ B. Tanto o I κ Ba como o I κ Bb ligam-se ao p50, tornando a sequência localizadora de núcleo inacessível, impedindo sua translocação. O desmembramento do complexo I κ B/ NF- κ B permite o transporte do NF- κ B para o núcleo, com consequente ligação desse nos genes que apresentam a sequência regulatória GGGACTTCC junto à região promotora, levando a um aumento na expressão do gene alvo (GHOSH et al., 1998).

Lysle et al. (1993) demonstraram que a ativação do receptor opioide é imunomoduladora, mostrando que o tratamento com morfina atenua vários índices de ativação imune, incluindo a proliferação de linfócitos, atividade da célula natural killer e expressão de citocinas. Estes e outros efeitos são muito susceptíveis de serem mediados através de receptores opioides que são expressos na superfície das células do sistema imunológico (SHARP et al., 1998; MAKARENKOVA et al., 2001). Kraus et al. (2003) demonstram convincentemente que expressão do receptor opioide em células do sistema imune é rigidamente controlado pelo NF- κ B via receptor do TNF, desencadeando um mecanismo em cascata de produção de interleucinas.

Os níveis do mRNA do receptor opioide são indetectáveis em condições basais, incluindo em células dendríticas, células T e CD38 primárias e, também, em célula endotelial e linhagens de células de monócitos. No entanto, a ativação do receptor de TNF em cada uma dessas células induz fortemente expressão de mRNA do receptor opioide μ . Estudos convincentemente apontam NF- κ B como o necessário coativador transcricional necessário para esta indução (LISLEY et al., 1993).

Bielinska et al. (1990) fizeram um estudo no qual mostraram que transfecção com oligonucleotídeos compatíveis com elementos do NF- κ B foi usada para inibir indução de

mRNA do receptor de opioide via indução por TNF, considerando que mesmo incluindo o ativador da proteína 1, não exerceu efeito aparente na capacidade de resposta do TNF.

Opioides, entre outros efeitos imunomoduladores, estão relacionados com equilíbrio de células Th e promoção da diferenciação de células Th2. Muito provavelmente, isto é devido ao efeito de opioides para induzir IL-4 e inibir a expressão de IFN-gama em células T. Nesse cenário, é estabelecido um circuito regulador positivo, já que a liberação de IL-4 induzida por opioides induz ainda mais a expressão de receptores de opioides μ . Para aumentar ainda mais essa complexidade, ficou demonstrado que os canabinoides induzem receptores de opioides μ , indução que é mediada por IL-4, e que explica os efeitos sinérgicos imunomoduladores de canabinoides e opioides (KRAUS et al., 2009).

Os neuropeptídios podem ser liberados juntos quando impulsos antidrômicos atingem o nervo. Este efeito é mais comumente estudado nas regiões cutâneas. A pele é densamente integrada com os nervos sensoriais e fibras C, incluindo aqueles que inervam as camadas epidérmicas como terminais nervosos livres. Estes nervos são ativados por estímulos térmicos, mecânicos e químicos para desempenhar um papel importante na detecção de mudanças ambientais externas. Tentativas de elucidar os mediadores neurogênicos envolvidos em tal resposta são contraditórias. No entanto, a substância P (SP) é o mediador mais conhecido para aumentar a permeabilidade microvascular e potencialmente causar vasodilatação (LEMBECK; HOLZER, 1979) enquanto proteína relacionada ao gene da calcitonina (CGRP) é um potente vasodilatador microvascular e é provavelmente responsável pela maior parte da vasodilatação neurogênica observada na pele humana (BRAIN et al., 1985).

Os primeiros mediadores que foram amplamente estudados neste contexto incluem derivado de mastócitos, histamina, fator de crescimento do nervo (NGF) e triptases, todos conhecidos por ter grandes contribuições à inflamação cutânea. A ativação na liberação de neuropeptídeos, como o CGRP e a SP de forma neurogênica, contribuem ainda mais para manter a resposta inflamatória (HARVIMA; NILSSON; NAUKKARINEN, 2010).

1.9 Reparo de feridas cutâneas

A cura da ferida cutânea desencadeia uma cascata de eventos distribuída em fases, envolvendo hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Fatores solúveis, incluindo citocinas e fatores de crescimento são liberados por células residentes e inflamatórias para iniciar o recrutamento e proliferação de células necessárias para a formação de novos tecidos. Opioides também são lançados a partir de células inflamatórias no local da lesão, enquanto

receptores opioides são conhecidos por sua ativação na periferia e em neurônios no GRD em condições dolorosas. Além disso, neuropeptídeos liberados dos terminais após lesão do nervo estimulam a inflamação neurogênica, angiogênese e cicatrização de feridas. Liberação de neuropeptídeos durante a fase de proliferação pode ter um efeito benéfico na cicatrização de feridas, mas seu aumento sustentado pode levar à inflamação amplificada e contribuir para a sua perpetuação e insuficiência no processo da cicatrização (WANG et al., 2017).

Na infecção por leishmaniose cutânea, em uma lesão nodular inicial desenvolve-se resposta inflamatória aguda contendo neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Esta reação inflamatória é acompanhada de uma redução no número de parasitos na derme. Embora os macrófagos sejam as células inflamatórias predominantes no local da infecção, na derme também apresentam-se neutrófilos, linfócitos T e B e células de Langerhans. São também observadas na derme áreas de necrose contendo células apoptóticas e neutrófilos. Queratinócitos proliferam na camada granulosa da epiderme, com hiperplasia. Em alguns pacientes, a hiperplasia é associada com presença de amastigotas na epiderme seguindo-se uma vigorosa resposta inflamatória por macrófagos e necrose dérmica desenvolvendo uma lesão exsudativa ulcerada. Nesta fase, linfócitos T CD4 + e CD8 + infiltram-se no local da lesão e aumentam a produção de IL-10, TNF- α e IFN- γ e transformação da população do tipo de macrófagos 1 para tipo 2. Na derme, em lesões ulceradas crônicas há um número variável de parasitos e ocorre aumento de produção de IL-10, TGF- β e IL-4 (NYLÉN; EIDSMO, 2012; ABDOLI et al., 2017); ocorrendo uma troca de perfil Th1 para Th2 entre a fase nodular e a fase ulcerada.

Nos estudos em ferida por esporotricose, tem sido demonstrada indução de um perfil Th2 com produção de IL-10 e IL-4 por *S. schenckii*, com um perfil in situ semelhante ao da leishmaniose cutânea ulcerada (MORGADO et al., 2016). As lesões granulomatosas de pele, assim como na esporotricose e na leishmaniose cutânea, podem exibir distintas apresentações histopatológicas tais como diferentes concentrações de macrófagos; granulomas tuberculoides ou supurativos, alguns com quantidades diferentes de microabscessos ao lado de granulomas; hiperplasia e hiperplasia pseudoepiteliomatosa da epiderme (QUINTELLA, 2012).

Em estudo experimental, Cangussu e colaboradores (2013) observaram diminuição de IL-6 e IL-10 em camundongos Balb C com lesões de leishmaniose e diminuição da nocicepção, mesmo com nervos aparentemente preservados. Úlceras indolores na LC sugerem interferência da doença na percepção da dor. A evolução prolongada em alguns pacientes poderia ser favorecida pela menor nocicepção, levando-os a procurar diagnóstico e tratamento tardiamente (CANGUSSU et al., 2014).

1.10 Inflamação neurogênica

A inflamação neurogênica consiste na liberação de neuropeptídeos cutâneos pró-inflamatórios diante de um estímulo nociceptivo que corre por via axonal.

A epiderme interage de forma intrínseca com terminações nervosas, e tanto epiderme quanto os nervos produzem substâncias para o sustento mútuo. Os neuropeptídeos, como SP e CGRP, são produzidos por nervos sensoriais na derme; eles induzem os mastócitos a liberar aminas vasoativas que facilitam a infiltração de neutrófilos e células T. Os receptores acoplados à proteína G de mastócitos (MrgprX1), bem como o receptor ativado pela protease 2 têm papéis importantes na inflamação. A ativação de MrgprX1 degranula mastócitos para se comunicar com o nervo sensorial e células cutâneas para o desenvolvimento de inflamação neurogênica. Mrgprs e receptor transitório potencial vaniloide 4 (TRPV4) são cruciais para a geração de doenças da pele como rosácea, enquanto SP, CGRP, somatostatina, β -endorfina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), e outros neuropeptídeos podem fazer imunomodulação durante as doenças cutâneas envolvidas com neuroinflamação. O aumento do nível de SP, em dermatite atópica, induz a liberação de interferon (IFN)- γ , IL-4, TNF- α e IL-10 dos leucócitos mononucleares periféricos do sangue. Portanto a inflamação neurogênica pode levar a sintomas sistêmicos com repercussão à distância devido ao aumento das substâncias acima. Estamos finalmente começando a entender as intrínsecas conexões entre os neurônios e a pele e como sua interação pode ser a chave para controlar a inflamação (CHOI; NARDO, 2018).

Estímulos diversos desencadeiam uma resposta inflamatória cutânea induzindo diretamente queratinócitos epidérmicos para elaborar citocinas específicas pró-inflamatórias e moléculas de adesão. As consequências são a ativação de células endoteliais microvasculares dérmicas e acumulação seletiva de células mononucleares na derme e epiderme. Assim, os queratinócitos podem agir como "transdutores de sinal", capazes de converter estímulos exógenos e endógenos em produção de citocinas, moléculas de adesão e fatores quimiotáticos (agindo de forma autócrina e parácrina) responsável pela iniciação de inflamação cutânea "antígeno independente". A fase de iniciação pode facilitar ou promover uma fase de amplificação com produção adicional de TNF α e IFN-gama através de uma via de ativação "antígeno-dependente" que inclui ativação celular entre queratinócitos, células linfocíticas T e células dendríticas. A ativação direta dos queratinócitos, com sua capacidade de produzir o repertório completo de citocinas pró-inflamatórias, pode levar ao recrutamento de células imunocompetentes, proporcionando assim o gatilho responsável para alterações rápidas e dramáticas que ocorrem após contato entre a epiderme e uma série de agentes ativadores

endógenos e exógenos. Uma seqüela comum do processo inflamatório é a hiperproliferação epidérmica, manifestada pela hiperplasia epidérmica. Vários fatores são considerados responsáveis pela proliferação de queratinócitos, e podem ser induzidos pelo IFN- γ , TNF alfa, IL-6, IL-8, neuropeptídeos, e receptor opioide. Assim, hiperproliferação anormal de queratinócitos pode estar ligada diretamente a citocinas liberadas pela epiderme inflamada, com efeito autócrino e parácrino, como também moléculas de adesão como ICAM-1, ELAM-1 e VCAM-1, que por feito parácrino, ativam células endoteliais (BARKER et al., 1991).

Alguns dos fatores que podem ativar queratinócitos são neurotransmissores de neuroreceptores contidos na epiderme, que por estímulo endógeno via células de Schwann pode secretar TNF- α (SCHOLZ; WOOLF, 2007; SACERDOTE et al., 2008) IL-1, IL-6 (MARTUCCI et al., 2008; WANG et al., 2012), COX2 (TAKAHASHI et al., 2004), e NGF (TANIUCHI et al., 1988).

Existe uma comunicação que ocorre entre neurônios nociceptores e o sistema imunológico para regular a defesa do hospedeiro, dor e doenças inflamatórias. Células do sistema imunológico em terminais de nervo periférico e no interior da medula espinhal liberam mediadores que modulam a sensibilidade mecânica e térmica. Por sua vez, os neurônios nociceptores liberam neuropeptídeos e neurotransmissores de terminais nervosos que regulam as respostas imunes inata, imune adaptativa, vascular e celular. Portanto, o diálogo entre os neurônios nociceptores e o sistema imunológico é um aspecto fundamental da inflamação, aguda e crônica (CHOI, NARDO, 2018).

Os neurônios nociceptores também são sensibilizados por TNF alfa, IL-1b e IL-6, produzidos por queratinócitos (ROOSTERMAN, 2006), mastócitos, macrófagos e neutrófilos. Uma vez ativados, conduzem o estímulo para o GRD e corno lateral da medula espinhal e conduzem ao tálamo e mesencéfalo, e retornam pelo sistema nervoso, com inibição da atividade simpática local, proporcionando vasodilatação. Esta condição facilita a inversão do fluxo celular para a periferia do vaso, facilitando a comunicação da célula endotelial com os imunócitos circulantes.

Objetivamos estudar os aspectos histológicos e de imunohistoquímica das lesões ulceradas de leishmaniose cutânea e de esporotricose, especialmente a expressão tecidual de receptores de opioides para observar a associação com manifestação clínica de presença ou ausência de dor local e comparação dos aspectos teciduais nas lesões ulceradas de ambas as enfermidades. Por outro lado, analisamos a expressão tecidual de MOR nas lesões de pacientes lepromatosos, com e sem reação tipo eritema nodoso hansênico.

2. JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose cutânea na sua forma localizada (típica) é reconhecida pela ocorrência de úlceras cutâneas, uma ou poucas, não dolorosas (PESSÔA; BARRETO, 1948). Muitos pacientes apenas referem uma sensação de dor quando manipulam a lesão ou esta tem contato com água. A sensação dolorosa na leishmaniose cutânea está comumente associada a infecção secundária, com presença de exsudato purulento (ANTONIO-OLIVEIRA, 2016). Por outro lado, as lesões de esporotricose são frequentemente referidas como apresentando dor local, que varia de intensidade de paciente para paciente. Esta informação constitui um dos sintomas clínicos relevantes no diagnóstico diferencial entre ambas as infecções (ANTONIO-OLIVEIRA, 2016). Já a hanseníase é a enfermidade paradigmática da lesão cutânea indolor, embora as lesões de eritema nodoso hansênico classicamente se apresentem como nódulos eritematosos dolorosos.

A interação de MOR com opiodes endógenos tem sido referida na literatura em relação a células do sistema imune induzindo analgesia (STEIN, 2012). MOR e opioides afins têm sido investigados na literatura como moduladores de inflamação como fatores pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios in situ, sendo por vezes apontados com fatores imunossupressores (STEIN, 2018).

O estudo da expressão de MOR com manifestações dolorosas ou não nestas doenças granulomatosas motivou este trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Estudar a expressão tecidual do receptor opioide μ em doenças granulomatosas da pele, correlacionando com presença ou ausência de dor local em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea ou com esporotricose, e com presença de episódios reacionais tipo eritema nodoso hansênico em casos de hanseníase multibacilar LL.

3.2 Objetivos secundários

1- Comparar lesões ulceradas de pacientes com leishmaniose cutânea típica e pacientes com esporotricose, com informação da presença ou ausência de dor na consulta em que foi realizada a biópsia para fins diagnósticos, correlacionando aspectos histopatológicos e expressão de receptor opioide μ .

2- Comparar expressão de receptor opioide μ em pacientes hansenianos com forma multibacilar (LL) sem episódio reacional, portanto de baixo perfil inflamatório, com pacientes com hanseníase multibacilar (LL) com quadro reacional tipo eritema nodoso hansênico, com alta atividade inflamatória.

4. MÉTODOS

Esta tese será apresentada através de dois artigos:

Artigo 1 - Study of the μ opioid receptor in cutaneous ulcers of leishmaniasis and sporotrichosis according to the complaints of local pain

Este artigo foi publicado no periódico Open Journal of Tropical Medicine, e responde ao objetivo secundário 1.

Pignataro PE, Quintella LP, Ferreira LC, de Carvalho Rodrigues FDC, Antonio Oliveira LDF, et al. (2019) Study of the μ opioid receptor in cutaneous ulcers of leishmaniasis and sporotrichosis according to the complaints of local pain. Open J Trop Med 3(1): 007-013. DOI: <https://dx.doi.org/10.17352/ojtm.000009>

Artigo 2 - Mu - opioid receptor expression in multibacillary leprosy

Este artigo foi publicado no periódico Open Journal of Tropical Medicine, e responde ao objetivo secundário 2.

Pignataro PE, Quintella LP, Ferreira H, Amorim AL, Pinheiro RO, et al. (2019) Mu - opioid receptor expression in multibacillary leprosy. Open J Trop Med 3(1): 014-019. DOI: <https://dx.doi.org/10.17352/ojtm.000010>

Os estudos foram submetidos ao Conselho de Ética com termo de consentimento esclarecido (Anexo1, 2 e 3), e aprovação em março de 2017.

4.1 ARTIGO 1:

Research Article

Study of the μ opioid receptor in cutaneous ulcers of leishmaniasis and sporotrichosis according to the complaints of local pain

Patrícia Elizabeth Pignataro^{1,2*}, Leonardo Pereira Quintella², Luiz Cláudio Ferreira², Francisco das Chagas de Carvalho Rodrigues², Liliâne de Fátima Antonio Oliveira², Marcelo Rosandiski Lyra² and Maria Inês Fernandes Pimentel²

¹Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received: 04 December, 2019

Accepted: 30 December, 2019

Published: 31 December, 2019

*Corresponding author: Patricia Elizabeth Pignataro, Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, 21040-900, Brazil, Tel: +5521999984721; E-mail: pignatarop@hotmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6997-9507>

Keywords: Opioid receptor; Cutaneous leishmaniasis; Sporotrichosis; Ulcer; Nociception

<https://www.peertechz.com>

 Check for updates

Abstract

Patients with cutaneous leishmaniasis or sporotrichosis with ulcerated lesions may present similar epidemiological and clinical characteristics. Local pain is often referred to in the sporotrichosis lesions, but not in cutaneous leishmaniasis. The μ Opioid Receptor (MOR) is indirectly associated to the production of cytokines, and is related to the epidermal proliferation. The aim of this study was to evaluate MOR expression and the histopathological changes in cutaneous lesions of sporotrichosis and leishmaniasis, and its association with complaints of local pain. Thirty-eight outpatients with sporotrichosis (19), leishmaniasis (14) and unspecific ulcers (5) treated at Rio de Janeiro, Brazil, were submitted to histological and immunohistochemically analysis for MOR according to the complaints of local pain. No association was found among the expression of MOR; the cutaneous histopathological changes of cellular composition of the inflammatory infiltrate tissue, of keratinocyte, of endothelial cells and of nerves; and the presence or absence of local pain in the cutaneous lesions of leishmaniasis, sporotrichosis or unspecific ulcers. A plausible explanation is that nociception is regulated by neurons of the dorsal root ganglion or by descending modulation through noradrenergic inhibitory neurons from central nervous system.

Introduction

American cutaneous leishmaniasis and sporotrichosis are endemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, with overlapping geographical areas. Both diseases present with similar clinical aspects, usually ulcers in the site of the inoculation of the infectious agent, and it is necessary to establish differential diagnosis between them. One of the distinctive clinical conditions is the presence or absence of local pain, being leishmaniasis ulcers generally painless [1]. On the other hand, sporotrichosis lesions are frequently necrotic painful ulcers with or without lymphatic involvement (Figure 1). Both diseases share similar histopathological aspects [2].

Leishmania (Viannia) braziliensis, the almost exclusive

species causing cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil [3], is a parasite with intracellular growth.



Figure 1: Left: Localized leishmaniasis presenting with an ulcerative skin lesion, with infiltrated borders, on the left wrist. Right: Sporotrichosis presenting with an ulcerative skin lesion, with infiltrated borders, on the arm. Source: Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

007

Citation: Pignataro PE, Quintella LP, Ferreira LC, de Carvalho Rodrigues FDC, Antonio Oliveira LDF, et al. (2019) Study of the μ opioid receptor in cutaneous ulcers of leishmaniasis and sporotrichosis according to the complaints of local pain. Open J Trop Med 3(1): 007-013. DOI: <https://dx.doi.org/10.17352/ojtm.000009>



In leishmaniasis, a few weeks post infection, a nodular lesion develops and displays acute inflammatory response (containing neutrophils, macrophages, and eosinophils). This inflammatory reaction is accompanied by a reduction in parasite numbers in the dermis. Macrophages are the major inflammatory cells at the infection site. However, neutrophils, T and B lymphocytic cells, and Langerhans cells are also present and necrotic areas containing apoptotic neutrophils are observed in the dermis. Keratinocytes proliferate in the granular layer of epidermis with hyperplasia. Following the vigorous inflammatory response caused by macrophages, dermal necrosis develops and the lesion becomes ulcerative. At this stage, CD4+ and CD8+ T cells predominate in the infiltrate and there is an increase in the production of interleukin (IL)-10, Tumor Necrosis Factor (TNF)- α and interferon (IFN)- γ as well as transformation of macrophages from type 1 to type 2. There are variable numbers of parasites, according to the species, and IL-4, IL-10, and Transforming Growth Factor (TGF)- β production increases in non-healing lesions [4,5].

Sporotrichosis in the state of Rio de Janeiro is mainly caused by *Sporothrix brasiliensis* [6]. In sporotrichosis, dermis presents at an early stage inflammation with infiltration of neutrophils, plasma cells, and lymphocytes that may or may not be intense. Gradually, the usual ulcerated cutaneous lesion typically exhibits a granulomatous dermatitis surrounding a suppurative abscess, with the presence of a central zone composed of neutrophils and a few eosinophils, and an outer zone of lymphocytes and plasma cells. At a later stage, granulomas mainly consist of epithelioid cells. Small abscesses may be seen within granulomas. The histopathological findings are generally nonspecific and variable in different stages of the disease. The histopathological pattern is usually a combination of pyogenic and granulomatous reaction and may display epidermal hyperplasia, papillomatous acanthosis, hyperkeratosis, and intraepidermal microabscesses [7,8].

Experimental immunologic studies in the cutaneous lesions of leishmaniasis and sporotrichosis also show similar in situ profiles with high levels of activated type 2 macrophages and production of IL-4 and IL-10 [9].

Inflammatory mediators are released and tissue acidification activates nociceptive primary afferent neurons that stimulate the sensation of pain causing hyperalgesia [10]. Immunocytes are recruited and release interleukins performing their functions in the process of healing the cutaneous lesion in an orchestrated way. The cytokine cascade results in the activation of COX-2 dependent prostanoid and in the release of catecholamine from sympathetic fibers [11]. Cytokines such as IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-8 are related to the pain threshold. On the other hand, opioid peptides render nociceptors less sensitive to excitation and thus inhibit the action of multiple excitatory mediators. Opioid peptides do not bind exclusively to one unique opioid receptor, but instead exhibit affinity for various opioid receptors including μ -, δ - and κ -opioid receptors [10,12]. Endogenous opioids as endorphins and enkephalin act primarily on μ and δ opioid receptors. They are synthesized *in vivo* in order to modulate pain mechanisms and inflammatory

pathways, and mediate analgesia in response to painful stimuli by binding to opioid receptors on sensitive cutaneous nerves. Opioids produced by cells of the immune system and keratinocytes are capable of exerting additional effects, such as immunomodulation in cutaneous inflammation. β -endorphin is present in macrophages, monocytes, granulocytes, and lymphocytes, in secretory granules arranged at the cell periphery, ready for exocytose. During the early stages of inflammation, as the leukocytes migrate to the site of infection, they (along with the resident cells) secrete various chemokines such as IL-1, IL-6, IL-8, which lead to hyperalgesia. In the late inflammation stage, macrophages and lymphocytes secrete IL-4, IL-10 and IL-13 inhibiting the hyperalgesic pathways leading to hypoalgesia [13]. Pain perception depends upon the activation of specialized peripheral neurons called Primary Afferent Nociceptors (PANs) from primary afferent fibers ($A\beta$ -, $A\delta$ -, and C-fibers) [14].

The peripheral anti-nociceptive action of μ -opioid receptors (MOR) agonists is greatly increased in inflamed tissues. This is in part due to stimulation of the MOR synthesis in the Dorsal Root Ganglion (DRG) induced by cytokines, especially Neural Growth Factor (NGF), and its transport to peripheral terminals. Furthermore, immune cells, guided to the inflamed region by cell adhesion molecules, are stimulated by local cytokines to secrete endogenous opioid peptides, including β -endorphin and enkephalin that bind to the opioid receptors. In addition to peripheral and central pain transmission neurons, MOR agonists produce analgesia by acting on a pain modulation circuit that includes regions of the Central Nervous System. In summary, MOR analgesia depends upon a set of widely distributed neural targets that include NAPs, ascending pain projection neurons and a top-down pain modulatory circuit [14].

Some experimental studies on nociception in leishmaniasis have been performed in order to better understand the profile of cytokines related to pain, without a satisfactory conclusion [15,16]. The purpose of this study was to determine the profile of MOR staining in the well established cutaneous ulcerated lesions of leishmaniasis and sporotrichosis in patients from Rio de Janeiro, Brazil, and to associate the MOR staining profile with the presence or absence of pain in the cutaneous lesions of both diseases.

Materials and methods

Series of 38 patients attended between 2013 and 2019 with a confirmed diagnosis by culture of localized cutaneous ulcers of leishmaniasis (n=14; 6 with local pain) or sporotrichosis (n=19; 9 with local pain), along with five patients with unspecific cutaneous ulcers (2 with pain) that were treated at the Laboratory of Clinical Research and Surveillance in Leishmaniasis, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil. Fragments of skin lesions previously obtained through biopsy were selected according to the information of presence of pain without gradation of intensity, or absence of it in the cutaneous ulcers at the same day they were submitted to biopsy for diagnostic purposes. Exclusion criteria were the presence



of viral (HIV) or metabolic diseases (diabetes) that could alter the perception of pain. The biopsy tissue specimen was fixed in formalin, embedded in paraffin and microtome sections were obtained for histochemistry (hematoxylin & eosin) and immunoreactivity for anti-opioid μ -receptor.

Histopathology

The histopathological analysis focused on changes in the epidermis (hyperplasia or pseudoepitheliomatous hyperplasia), and dermal changes as type of granuloma (compact - clusters of epithelioid cells; or loose - sparse epithelioid cells surrounded by edema), presence and semi quantitative analysis of cells of the mononuclear phagocytic system (analysis of macrophages and epithelioid cells), of polymorphonuclear cells and the presence or absence of necrosis, according to the clinical data of painful or painless cutaneous lesions.

Immunohistochemistry

Anti-opioid μ -receptor (AB1580-I Merk Millipore-Sigma-Aldrich, batch number #3046772) was used for immunohistochemistry analysis. Heat induced epitope retrieval was performed in EDTA, pH 8.0, for 30min at 98°C. Reaction was detected by phosphatase alkaline kit (GBI Labs, Bothel, Washington, USA) and revealed with permanent red [17]. The sections were counterstained with hematoxylin. Immunohistochemistry staining was analyzed semi quantitatively in epidermis and semi quantitative analysis of dermal macrophages was also performed (0 to 3+).

Fisher's exact test was used for histochemistry and immunohistochemistry results, and significance was considered at a level of 5%. Analysis was performed using color-based image analysis (with permanent red) to evaluate extent and quantitatively intensity of the staining from 1+ to 3+, (being 3+= strong; 2+=medium; 1+= weak). See the Figure 2. The reading of the slides was performed by two pathologists under light microscopy, with agreement of the results.

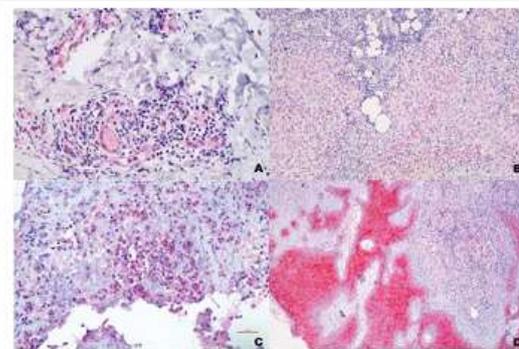


Figure 2: Immunohistochemistry staining with permanent red of μ -opioid receptor. A) Medium intensity staining in granuloma with giant cell and endothelial cells. B) Medium intensity of staining of macrophages. C) Medium staining in polymorphonuclear cells in a necrosis area. D) Strong staining in pseudoepitheliomatous hyperplasia in unspecific ulcer, weak staining in small vessels. A, B - cutaneous leishmaniasis; C - sporotrichosis. A and C magnification 20X. B magnification 10X. D, magnification 4X.

Ethical approval

Full consent was obtained from the participants prior to the study on the basis of informed consent and led by experienced professionals in infectious diseases and immunohistochemical techniques.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation (certificate number CAAE 61115716.5.0000.5262).

Results

Compact granuloma (mature epithelioid cells in clusters) were present in 50% of the leishmaniasis cutaneous lesions, in 22% of the sporotrichosis cutaneous lesions, and were absent in unspecific ulcers. Cutaneous lesions regardless of the disease presented neutrophils in more than 64% of the cases. Loose granuloma (immature epithelioid cell spread in the dermis) was present respectively in 50% and 88% of cases. Necrosis was present in 27% in the leishmaniasis cases, 69% in the sporotrichosis cases, and it was absent in unspecific ulcers. Pseudoepitheliomatous hyperplasia was more frequent in the leishmaniasis cutaneous lesions (85%) than in sporotrichosis (57%). The finding of a larger proportion of women in the sporotrichosis cases happened out of random. There were no statistically significant results between gender or age and the presence of pain (Tables 1,2).

The histopathological presentation of lesions regarding type of granuloma (compact or loose) and the presence of micro abscesses of polymorphonuclear cells or necrosis did not correlate with the presence or absence of local pain (Figure 3).

MOR staining had irregular distribution in epidermis with higher intensity in the areas with pseudoepitheliomatous hyperplasia. It was also present, although in lower intensity, in macrophages and epithelioid cells. It was present in some nerves and in the endothelial cells (Figures 3-5).

There was no association between the clinical complaint of pain in the lesions and the intensity of the MOR staining.

Discussion

A comparison between histopathological changes and immunohistochemical expression of MOR in painful and painless cutaneous ulcers of leishmania, sporotrichosis and also in unspecific ulcers was performed. Ulcerated cutaneous lesions of leishmaniasis and sporotrichosis did not show significant differences between histopathological aspects or intensity of μ -opioid receptor staining when comparing lesions with presence or absence of local pain. However, there was stronger staining in the areas with pseudoepitheliomatous hyperplasia, a finding not yet described in the literature (Table 2).

The keratinocytes are surrounded by inflammatory infiltrate being stimulated and releasing cytokines and growing factors, including NGF and opioids. Probably the high intensity

**Table 1:** Histopathological and immunohistochemical characteristics of cutaneous lesions of patients with leishmaniasis or unspecific ulcers. Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

Code	Disease	Sex	Age	Pain	Epidermis	Granuloma	Necrosis	PMN	MOR Epi	MOR Mac
2816/15	Leish	M	25	no	hp	compact	no	1+	1+	2+
192/14	Leish	F	9	no	hp	loose	no	2+	3+	0
162/14	Leish	F	11	no	pehp	compact	no	1+	1+	1+
2229/15	Leish	M	76	yes	pehp	compact	no	0	3+	1+
1140/15	Leish	M	71	yes	pehp	loose	no	2+	3+	2+
4918/14	Leish	M	26	yes	hp	compact	no	0	2+	2+
2808/14	Leish	M	44	yes	pehp	compact	no	0	3+	2+
1350/19	Leish	M	19	no	pehp	compact	no	0	2+	2+
13094/18	Leish	M	44	no	pehp	loose	yes	1+	2+	2+
1290/19	Leish	M	61	yes	pehp	loose	yes	2+	3+	2+
2456/17	Leish	F	52	yes	pehp	loose	yes	1+	3+	2+
12540/18	Leish	M	27	no	absent	loose	yes	1+	-	2+
15207/17	Leish	M	28	no	hp	compact	yes	1+	1+	1+
3915/16	Leish	M	35	no	pehp	loose	yes	2+	1+	0
648/07	Un.ulcer	F	55	no	hp	absent	no	1+	2+	0
238/07	Un.ulcer	M	21	yes	pehp	absent	no	1+	2+	0
1506/07	Un.ulcer	F	44	yes	hp	absent	no	1+	2+	0
733/07	Un.ulcer	M	47	no	hp	absent	no	1+	1+	0
3431/08	Un.ulcer	M	16	no	pehp	absent	no	1+	3+	0

PMN = polymorphonuclear cells; MOR Epi = μ -opioid receptor at epidermis; MOR mac = μ -opioid receptor at macrophages; Sporo = sporotrichosis; hp = hyperplasia; pehp = pseudoepitheliomatous hyperplasia. In all cases, MOR staining was granular and cytoplasmic. Immunostain: (-) negative, (+) weakly positive, (++) positive, (+++) strongly positive.

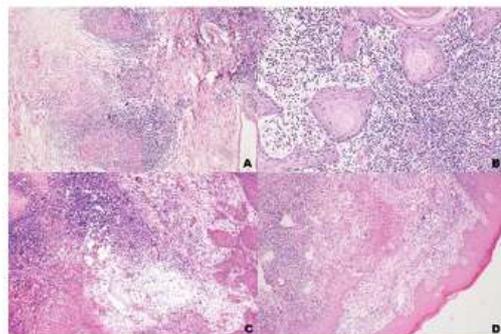


Figure 3: Compact and loose granuloma in cutaneous leishmaniasis (A and B) and sporotrichosis lesions (C and D). A) Epithelioid compact granulomas surrounded by lymphocytic cells. B) Pseudoepitheliomatous hyperplasia with horn pearls surrounded by loose granuloma in cutaneous leishmaniasis. C) Compact granuloma is shown in the upper left corner. In the left bottom, area of necrosis. At the center, area with edema. At the right, pseudoepitheliomatous hyperplasia. In the right upper corner, loose granuloma. D) Loose granuloma with central necrosis and pseudoepitheliomatous hyperplasia. Magnification 10X.

of protease and peptidase from the local inflammatory activity destroyed opioids in those patients who referred to painful lesions. On the other hand, in those patients with painless lesions, a possible explanation is that the anti-nociception came from the DRG neurons.

Opioids from Immunocytes interacting with receptors on sensory nerves inhibit nociception in inflammation

sites. Increased amounts of opioid peptides in immune cells infiltrating the inflamed tissue include macrophages, mast cells, lymphocytes, plasma cells and polymorphonuclear leukocytes [18].

Opioids are also released from the inflammatory cells acting at paracrine way at the site of injury, while opioid receptors are activated in the periphery and DRG neurons in painful conditions. Opioid receptors have a key role in wound healing and homeostasis [19].

Up regulation of opioid receptors and accumulation of opioid peptide-producing immune cells are detected at the site of nerve injury, accompanied by enhanced antinociceptive activity of opioid agonists. Immune cell-derived opioid peptides can block the excitation of nociceptors in nerves within injured tissue, as demonstrated in surgical patients [17].

The murine model is an excellent system for the analysis of Th1/Th2 differentiation in leishmaniasis. Resistance to *Leishmania (L.) major* depends on the development of a *L. major* specific Th1 response, while Th2 differentiation results in susceptibility to this pathogen. The epidermis is the major source of immunomodulatory mediators that triggers Th1 to Th2 differentiation. This epidermal gene induction was significantly stronger in resistant mice especially regarding genes known to promote Th1. Mice with a selective IL-6 deficiency in non-hematopoietic cells (including keratinocytes) showed a Th2 switch and dramatic deterioration of cutaneous leishmaniasis. These data suggest that epidermal cytokine expression may be

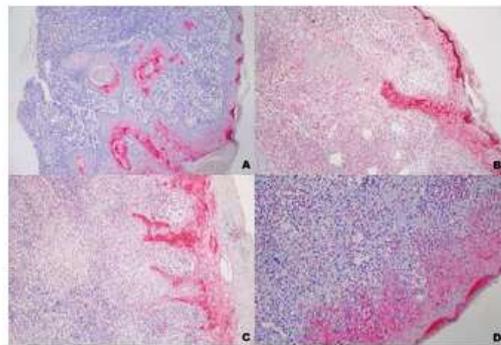


Figure 4: Immunohistochemistry staining with permanent red showing strong positivity in epidermis for μ -opioid receptor in painless (A and B) and painful (C and D) cutaneous lesions. Cutaneous leishmaniasis (A and C) and sporotrichosis lesions (B and D). A, B, C, magnification 4X. D, magnification 10X.

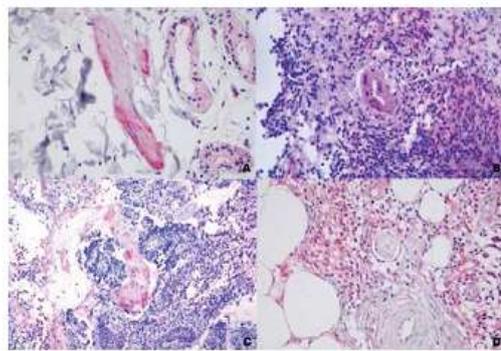


Figure 5: Immunohistochemistry staining with permanent red of μ -opioid receptor. A) Strong irregular staining in longitudinal section of a nerve. At the right, sudoriparous glands with weak staining. B) Medium irregular staining in the endothelial cells (center) and in inflammatory cells (right) C) Weak irregular staining in longitudinal section of a nerve. D) Weak staining in transversal section of a nerve surrounded by medium staining in inflammatory cells. In the bottom, a vessel and nerve with no staining. A, B, D – cutaneous sporotrichosis, magnification 40x, 20x, 40x respectively; C cutaneous leishmaniasis, magnification 20X.

a decisive factor in the generation of protective Th1 immunity and resolution of the inflammatory process [20].

The nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) is a protein complex that controls transcription of DNA, cytokine production and cell survival. NF- κ B is involved in cellular responses and plays a key role in regulating the immune response to infection. It has been reported that the MOR gene transcription in various immune cells, including human T lymphocytes, leukocytes, and mature dendritic cells, induced the proinflammatory cytokine TNF. NF- κ B was identified to be responsible for TNF-induced MOR gene expression on the human MOR gene promoter [21].

Keratinocytes probably are very active and may produce many cytokines that hinder the resolution of the inflammatory process, mainly IL-8 that sustain continuous recruitment of neutrophils. These cells produce others substances that

maintain the inflammation down-regulated by stimulating Th1 cells such as chemokines CXCL9, CXCL10, CXCL11 and CXCL1 and chemokines as CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 and CXCL8(IL8) which are among those of angiogenic family includes chemokines CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CCLX6, CXCL7 and CXCL8 (IL8). On the other hand, neutrophils-derived cytokines lead to the persistence of the inflammatory process, expressing pro-inflammatory (TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17) or anti-inflammatory cytokines, besides angiogenic or fibrogenic factors [22].

In the cutaneous lesions of sporotrichosis and leishmaniasis the observation of neutrophils and necrosis in the wound is very usual even in deeper dermis [9]. Many times there is no complaint of pain, even with a lot of enzymes and peptidases acidifying the environment. So another explanation besides local opioid production should be postulated. Some authors reported experiments with rats pursuing explanations for neuropathic pain, and found out that MOR comes from DRG through the peripheral nerves and blocks the local pain. NGF up regulates MOR in DRG. This is followed by enhanced axonal MOR transport towards peripheral nerve terminals and subsequent increase of MOR in nerve fibers within skin. NGF-induced effects occurring through DRG to peripheral nerve fibers and the potentiating of antinociception were abrogated by NGF neutralization. This suggests that NGF not only contributes to inflammatory pain but also governs the MOR up regulation, resulting in enhanced opioid susceptibility towards better pain control [23].

Intense tissue damaging stimuli activates primary afferent nociceptors in cell bodies in the DRG. The central terminals of the nociceptors contact second-order neurons in the dorsal horn of the spinal cord gray matter. Agonists of MOR directly inhibit pain transmitting neurons in the periphery and central nervous system. They also act on descending pain modulatory circuits that control spinal cord pain transmission provided by noradrenergic innervations of the dorsal horn [14].

A weakness of this study is to be a retrospective study. Further studies with larger number of patients and with gradation of local pain sensation would allow a better understanding on the issue of local pain in granulomatous infectious diseases of the skin.

In conclusion, the general concept that leishmaniasis presents mainly painless lesions or sporotrichosis presents painful lesions could not be directly demonstrated in this study. There was no association between MOR staining and the presence or absence of local pain in the cutaneous lesions of both diseases. Certainly, there must be pain modulation by local opioids, but the main modulation seems to be originated from the peripheral and central nervous system.

Acknowledgement

We thank to the Leishmaniasis Clinical Research and Surveillance Laboratory and the Pathology Department from Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation.

011

**Table 2:** Histopathological and immunohistochemical characteristics of cutaneous lesions of patients with sporotrichosis. Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

Code	Sex	Age	Pain	Epidermis	Granuloma	Necrosis	PMN	MOR Epi	MOR Mac
1151/14	F	17	no	hp	compact	no	0	2+	0
429/15	M	10	no	pehp	compact	yes	1+	1+	1+
3196/14	F	29	no	hp	loose	yes	3+	2+	1+
5917/13	F	57	yes	pehp	loose	yes	2+	3+	0
4184/13	F	21	yes	pehp	loose	yes	3+	3+	1+
2990/13	F	27	yes	hp	loose	yes	1+	1+	0
1483/14	F	11	yes	hp	loose	yes	3+	2+	2+
160/14	F	29	yes	hp	loose	yes	3+	-	1+
4468/14	F	5	no	pehp	loose	yes	1+	3+	1+
3529/14	F	13	no	pehp	loose	yes	2+	2+	3+
2054/14	F	13	no	pehp	loose	no	3+	2+	1+
1767/14	F	14	no	pehp	compact	yes	2+	2+	1+
4657/14	M	20	no	pehp	loose	yes	3+	3+	3+
1541/14	M	10	yes	hp	loose	yes	3+	2+	2+
3394/14	F	65	yes	pehp	loose	no	1+	3+	2+
2796/13	F	13	no	pehp	compact	no	0	3+	0
980/15	F	55	no	hp	loose	yes	3+	2+	1+
1820/14	M	40	yes	hp	loose	no	2+	1+	1+
1821/14	M	10	yes	pehp	loose	no	1+	2+	1+

PMN = polymorphonuclear cells; MOR Epi = μ -opioid receptor at epidermis; MOR mac = μ -opioid receptor at macrophages; Sporo = sporotrichosis; hp = hyperplasia; pehp = pseudoepitheliomatous hyperplasia. In all cases, MOR staining was granular and cytoplasmic. Immunostain: (-) negative, (+) weakly positive, (++) positive, (+++) strongly positive.

Financial Support

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) through code 001.

References

- Antonio LF, Pimentel MIF, Lyra MR, Madeira MF, Miranda LF, et al. (2017) *Sporothrix schenckii* Sensu Lato identification in fragments of skin lesion cultured in NNN medium for differential diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Diag Microbiol Infect Dis* 87: 118-120. [Link: http://bit.ly/2upk0Fh](http://bit.ly/2upk0Fh)
- Quintella LP, Passos SR, Miranda LH, Cuzzi T, Barros MB, et al. (2012) Proposal of a histopathological predictive rule for the differential diagnosis between American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. *Br J Dermatol* 167: 837-846. [Link: http://bit.ly/2MZhHIB](http://bit.ly/2MZhHIB)
- Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, et al. (2009) *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol* 121: 317-322. [Link: http://bit.ly/2sHws2M](http://bit.ly/2sHws2M)
- Nylén S, Eidsmo L (2012) Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 34: 551-561. [Link: http://bit.ly/2QRbLsV](http://bit.ly/2QRbLsV)
- Abdoli A, Maspi N, Ghaffarifar F (2017) Wound healing in cutaneous leishmaniasis: A double edged sword of IL-10 and TGF- β . *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 51: 15-26. [Link: http://bit.ly/2SYtrWY](http://bit.ly/2SYtrWY)
- Almeida-Paes R, Oliveira MME, Freitas DFS, do Valle AC, Zancopé-Oliveira RM, et al. (2014) Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. *PLoS Neglect Trop Dis* 8: 284-287. [Link: http://bit.ly/2MZnbtE](http://bit.ly/2MZnbtE)
- Zhang YQ, Xu XG, Zhang M, Jiang P, Zhou XY, et al. (2011) Sporotrichosis: clinical and histopathological manifestations. *Am J Dermatopathol* 33: 296-302. [Link: http://bit.ly/2QPrTv1](http://bit.ly/2QPrTv1)
- Quintella LP, Passos SR, do Vale AC, Galhardo MC, Barros MB, et al. (2011) Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. *J Cutan Pathol* 38: 25-32. [Link: http://bit.ly/2Qtw82B](http://bit.ly/2Qtw82B)
- Morgado FN, Schubach AO, Pimentel MI, Lyra MR, Vasconcelos EC, et al. (2016) Is there any difference between the in situ and systemic IL-10 and IFN- γ production when clinical forms of cutaneous sporotrichosis are compared? *PLoS One* 11: e0162764. [Link: http://bit.ly/35y4yUh](http://bit.ly/35y4yUh)
- Hua S, Cabot PJ (2010) Mechanisms of peripheral immune-cell-mediated analgesia in inflammation: clinical and therapeutic implications. *Trends Pharmacol Sci* 31: 427-433. [Link: http://bit.ly/35rHM00](http://bit.ly/35rHM00)
- Sommer C, Kress M (2004) Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett* 361: 184-187. [Link: http://bit.ly/2T7YgIr](http://bit.ly/2T7YgIr)
- Busch-Dienstfertig M, Stein C (2010) Opioid receptors and opioid peptide-producing leukocytes in inflammatory pain-basic and therapeutic aspects. *Brain Behav Immun* 24: 683-694. [Link: http://bit.ly/2Fr8uv7](http://bit.ly/2Fr8uv7)
- Ninkovic J, Roy S (2013) Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino Acids* 45: 9-24. [Link: http://bit.ly/37Q0lr9](http://bit.ly/37Q0lr9)
- Fields HL (2011) Mu opioid receptor mediated analgesia and reward. In: The opiate receptors. Gavril W. Pasternak, editor. New York Dordrecht Heidelberg London: Humana Press Springer 239-264. [Link: http://bit.ly/2SWyR8b](http://bit.ly/2SWyR8b)
- Cangussú SD, Souza CC, Castro MS, Vieira LQ, Cunha FQ, et al. (2013) The endogenous cytokine profile and nerve fibre density in mouse ear *Leishmania major*-induced lesions related to nociceptive thresholds. *Exp Parasitol* 133:193-200. [Link: http://bit.ly/35su7d](http://bit.ly/35su7d)
- Karam MC, Merckbawi R, El-Kouba JE, Bazzi SI, Bodman-Smith KB (2013) In



Leishmania major-induced inflammation, interleukin-13 reduces hyperalgesia, down-regulates IL-1 β and up-regulates IL-6 in an IL-4 independent mechanism. *Exp Parasitol* 134: 200-205. [Link: http://bit.ly/36pi8dE](http://bit.ly/36pi8dE)

17. Stein C (2018) New concepts in opioid analgesia. *Expert Opin Investig Drugs* 27: 765-775. [Link: http://bit.ly/2ZWR8ww](http://bit.ly/2ZWR8ww)
18. Stein C, Hassan AH, Przewlocki R, Gramsch C, Peter K, et al. (1990) Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5935-5939. [Link: http://bit.ly/2Frglch](http://bit.ly/2Frglch)
19. Wang Y, Gupta M, Poonawala T, Farooqui M, Li Y, et al. (2017) Opioids and opioid receptors orchestrate wound repair. *Transl Res* 185: 13-23. [Link: http://bit.ly/37LGsH7](http://bit.ly/37LGsH7)

20. Ehrchen JM, Roebrock K, Foell D, Nippe N, von Stebut E, et al. (2010) Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog* 6: e1000871. [Link: http://bit.ly/2ZVg5LX](http://bit.ly/2ZVg5LX)

21. Kraus J, Börner C, Giannini E, Höllt V (2003) The role of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-regulated transcription of the human mu-opioid receptor gene. *Mol Pharmacol* 64: 876-884. [Link: http://bit.ly/2Qrgoes](http://bit.ly/2Qrgoes)
22. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA (2014) Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol* 5: 508. [Link: http://bit.ly/36vJQFF](http://bit.ly/36vJQFF)
23. Mousa SA, Cheppudira BP, Shaqura M, Fischer O, Hofmann J, et al. (2007) Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. *Brain* 130: 502-513. [Link: http://bit.ly/2tAycKY](http://bit.ly/2tAycKY)

Discover a bigger Impact and Visibility of your article publication with Peertechz Publications

Highlights

- ❖ Signatory publisher of ORCID
- ❖ Signatory Publisher of DORA (San Francisco Declaration on Research Assessment)
- ❖ Articles archived in worlds' renowned service providers such as Portico, CNKI, AGRIS, TDNet, Base (Bielefeld University Library), CrossRef, Scilit, J-Gate etc.
- ❖ Journals indexed in ICMJE, SHIRAZ/ROMEO, Front Scholar etc.
- ❖ OAI-PMH (Open Archives Initiative) protocol for Metadata Harvesting)
- ❖ Dedicated Editorial Board for every journal
- ❖ Accurate and rapid peer-review process
- ❖ Increased citations of published articles through promotions
- ❖ Reduced timeline for article publication

Submit your articles and experience a new surge in publication services (<https://www.peertechz.com/submission>).

Peertechz journals wishes everlasting success in your every endeavours.

Copyright: © 2019 Pignataro PE, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

013

Citation: Pignataro PE, Quintella LP, Ferreira LC, de Carvalho Rodrigues FDC, Antonio Oliveira LDF, et al. (2019) Study of the μ opioid receptor in cutaneous ulcers of leishmaniasis and sporotrichosis according to the complaints of local pain. *Open J Trop Med* 3(1): 007-013. DOI: <https://dx.doi.org/10.17352/ojtm.000009>

4.2 ARTIGO 2:



MEDICAL GROUP

Research Article

Mu-opioid receptor expression in multibacillary leprosy

Patrícia Elizabeth Pignataro^{1,2*}, Leonardo Pereira Quintella², Helen Ferreira¹, Adelaide Lopes Amorim¹, Roberta Olmo Pinheiro¹, Luiz Claudio Ferreira², Francisco das Chagas de Carvalho Rodrigues² and Maria Inês Fernandes Pimentel²

¹Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received: 04 December, 2019

Accepted: 30 December, 2019

Published: 31 December, 2019

*Corresponding author: Patrícia Elizabeth Pignataro, Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, 21040-900, Brazil, Tel: +5521999984721; E-mail: pignatarop@hotmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6997-9507>

Keywords: Neurogenic inflammation; Multibacillary leprosy; Opioid receptors; Erythema nodosum leprosum

<https://www.peertechz.com>



Abstract

Background: During the clinical course of multibacillary leprosy disease, mainly in Lepromatous Leprosy (LL) patients, acute and systemic inflammatory episodes known as Erythema Nodosum Leprosum (ENL) may be present. The histology of ENL skin lesions initially shows hyperplasia of epidermis followed by a neutrophilic inflammatory process. Sensory neurons and keratinocyte communicate in paracrine way via molecules such as neuropeptides, cytokines, and opioids. Previous studies demonstrated that opioids might cause immunosuppression through Mu Opioid Receptor (MOR).

Objectives: To verify the expression of MOR in leprosy multibacillary patients with and without ENL.

Methods: Cutaneous lesions from fifteen patients with LL with no reaction and 18 patients with ENL from Oswaldo Cruz Foundation, Brazil, were studied. Immunohistochemistry reaction with anti-MOR antibody was performed in paraffin embedded skin lesions biopsy.

Results: Forty-six percent of LL patients without reactional episodes presented positivity for MOR in keratinocytes while in the ENL group 88.9% presented strong staining in epidermis ($p=0.02$). In lepromatous lesions, almost all macrophages were positive for MOR, in contrast to the rare positivity in ENL macrophages.

Main Conclusions: The data presented here suggest the involvement of MOR in the immunomodulation of ENL.

Introduction

Leprosy is an infectious disease predominantly of skin and peripheral nerves, caused by *Mycobacterium leprae*. Erythema nodosum leprosum (ENL, type 2 reaction) is a painful inflammatory condition occurring in around 50% Lepromatous Leprosy (LL) and 5% to 10% of Borderline Lepromatous (BL) patients, affecting 13.7% of leprosy patients in hospital-based studies [1]. ENL in the course of the disease occurs particularly in those patients with a bacterial index above 4+ [1]. The histopathological aspects of LL are an atrophic epidermis with a grenz zone of collagen without cells in the superficial dermis between the infiltrate and the epidermis. In the dermis, the infiltrate is composed by macrophages with vacuoles in variable amount and size, multinucleated giant cells, rare lymphocytes and numerous plasma cells is predominantly

perivascular, periadnexal and perineural without significant infiltration in perineurium. In ENL reaction, the epidermis becomes hyperplastic, and the grenz zone disappears. The infiltrate is prominently neutrophilic, mainly in the deep layers of the dermis and the subcutaneous tissue among new and pre lepromatous macrophage infiltrate, with a higher percentage of lymphocytes than before. Endothelial swelling, edema and vascular congestion are observed. Micro abscesses can occasionally be observed mainly in deep dermis where lymphocytes and macrophages are newly recruited and spread to the surrounding subcutaneous tissue [2].

Previous studies demonstrated that in lepromatous lesions there is a predominance of type 2 macrophages expressing CD163 and interleukin (IL)-10 [3,4]. Elevated serum levels of cytokines as IL-6, IL-10, IL-12, Tumor Necrosis Factor (TNF)



and other immunological mediators have been associated with episodes of ENL [5].

Primary sensory neurons, Schwann cells and immune cells act in coordinated patterns and cytokines and chemokines are involved in their signaling pathways [6]. Schwann cells, active resident and infiltrating macrophages, neutrophil granulocytes, and mast cells release prostaglandins and several pro inflammatory cytokines-including IL-1 β , IL-6, IL-12, interferon and TNF [6,7]. Skin cells and sensory neurons intercommunicate in autocrine and paracrine ways. There are close functional interactions between skin cells, particularly keratinocytes and neurons, as demonstrated by several molecules (neuropeptides, neurohormones, neurotrophins and their respective receptors) expressed in both skin and neuronal cells [7]. Expression of the Mu-Opioid Receptor (MOR) can be modulated by various cytokines, including IL-1 β , IL-4, IL-6 and TNF [8].

The phenomenon that cutaneous blood flow is increased in innervated areas when the respective dorsal roots are stimulated was first observed by Stricker, in 1876 [9]. Later, this led to the concept of neurogenic inflammation, in which sensory nerves contribute to the mechanism of inflammation. It describes the vasodilatation and protein extravasations caused by inflammatory neuropeptides [9]. The most important neuropeptides in the skin are substance P (SP), and Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP). SP is a known potent vasodilator. It is found in the fibers of the dermis and epidermis, in sweat glands, in Meissner corpuscles, in perivascular nerves and in Merkel cells. Nerve growth factor (NGF), also synthesized by keratinocytes, seems to strongly control the presence of SP of neural origin in the skin. SP and CGRP signaling can also stimulate keratinocytes to produce inflammatory mediators such as IL-1 β , IL-6, TNF, and NGF [8]. Neuropeptide stimulation causes up-regulation of neuropeptide receptor expression in keratinocytes and a dramatic increase in keratinocyte secretion of SP and CGRP [8], that could result in autocrine or paracrine stimulatory effects and amplification of neuropeptide signaling. Human keratinocytes produce and bind to β -endorphin, the endogenous MOR ligand. The opiate receptor system seems to be decisive in the direct communication between the nerves and the skin. Keratinocytes directly influence the unmyelinated nerve fibers in the epidermis via the secretion of β -endorphin [10].

Leukocyte chemotaxis, vascular hemodynamics and immune response are directly influenced by neuronal factors released from nociceptor sensory neurons. Noxious stimuli activate afferent signals in sensory nerves, leading to the generation of antidromic axon reflexes and inducing the release of neuropeptides at the peripheral terminals of the neurons. These molecular mediators have several inflammatory actions such as chemotaxis and activation of neutrophils, attraction of macrophages and lymphocytes to the site of injury, and degranulation of mast cells. Neuropeptides such as CGRP can induce dendritic cells toward a T-helper (Th) 2 immunity and reduce Th1 immunity through the production of certain cytokines and inhibition of others, as well as by reduction or increase of dendritic cell migration to local lymph nodes [11].

The opioid peptide endomorphin-2 has immunological effects on the production of cytokines related to inflammation, in Th1 / Th2 balance and in functions related to the innate immune system in macrophages in the murine model. Endomorphin-2 inhibits TNF, IL-10, and IL-12 productions, however, it potentiates IL-1 β production by macrophages [12]. These results suggest that endomorphin-2 may modify macrophage functions such as cytokine productions as well as functions related to the innate immune system.

MOR activation results in the enhancement in the activity and also the DNA-binding activity of the transcription factor Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) in primary neurons [13]. NF- κ B is responsible for the transcription of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in vertebrates.

Cells of the innate immune system respond to NGF through the activation of a variety of responses. NGF activates chemotaxis and enhances the phagocytosis of neutrophils and macrophages, stimulates the cytotoxic activity of eosinophils and induces the degranulation of mast cells [14]. The opioid system is related to MOR and also to NGF and it is implicated in immune and inflammatory reaction, with different responses.

The exact triggers leading to ENL reaction remains a challenging enigma in leprosy immunology. As long as neuroreceptors can lead to the release of neuropeptides by antidromic axon reflex as consequence of Schwann cell inflammatory activity, we postulate that epidermis may be a supporting role in the amplification of the inflammatory process, after vasodilatation and mast cell degranulation [9]. Keratinocytes can interact with infiltrating inflammatory cells, either by release of pro-inflammatory cytokines or via intercellular adhesion reactions [7].

Almost all cutaneous cells express functional receptors for neuropeptides. Skin cells produce neuropeptides and neurotrophins, which in turn stimulate nerve fibers [9]. The expression of MOR can be modulated by various cytokines and by endorphins and previous studies have demonstrated that immune cells can secrete β -endorphins [15]. In addition, immunohistochemical studies in dermatological diseases like psoriasis and rosacea have demonstrated an altered expression of various neuropeptides and of their receptors, as well as marked proliferation of cutaneous nerve in the skin [9]. Cutaneous and autonomic dysfunctions in leprosy are associated with changes in nerve fibers and neuropeptides [16].

Here, in order to evaluate neuroinflammation in the skin, we evaluated the expression of MOR in skin cells from lepromatous patients, known as presenting a low inflammatory profile, and compared to ENL patients, whose lesions display a highest inflammatory profile. Once the nociceptor is inside epidermis, it could shed neuropeptides through antidromic reflex originating pain and starting the inflammatory process from inflamed nerve bundles affected by mycobacteria.

Materials and methods

Study population

Series of 26 patients clinically classified as LL with or without ENL were selected according to the fragments of skin



lesions obtained through biopsy at Souza Araújo Outpatient Unit, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil before the start of the leprosy and / or reactional treatment (Table 1).

Histopathology

The histopathology of the cutaneous lesions of non-reactional patients (LL) and those with ENL were evaluated through hematoxylin and eosin (H&E) and Wade staining according to the Ridley & Jopling classification [17].

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed in formalin fixed,

paraffin embedded tissues, with anti-MOR antibody (AB1580-1 Merck Millipore-Sigma-Aldrich, Burlington, Massachusetts, USA, batch number #3046772) diluted 1: 4,000.

Tissue samples were deparaffinized in xylene and hydrated in decreasing alcohol series. Antigen retrieval was performed in EDTA, pH 8.0, for 30 min at 98°C and detected by phosphatase alkaline kit (GBI Labs, Bothel, Washington, USA) with permanent red according protocol [18]. The sections were counterstained with hematoxylin for 1 min, dehydrated in increasing alcohol series, and cleared in xylene. Immunohistochemistry staining was analyzed as positive or negative in epidermis and semi quantitative analysis of dermal

Table 1: Clinical and demographic characteristics of leprosy patients, Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

Patient code	Sex	Age	Clinical form	Time MDT	IBB	MOR EPI	MOR MAC
*30991	M	32	LL	0	6	0	2+
**31161			ENL	7	5	+	1+
*29354	F	39	LL	0	6	0	1+
**31003			ENL	40	3	0	1+
*29973	F	58	LL	0	5	0	1+
**31065			ENL	20	4	+	0
*29977	M	56	LL	0	6	+	0
**31040			ENL	32	4	+	0
*27320	M	44	LL	0	5	+	0
**31075			ENL	24	2	+	1+
*31126	M	45	LL	0	5	+	1+
**31163			ENL	3	4	+	0
*29034	F	33	ENL	0	4	0	0
**30963			ENL	48	3	0	0
30954	M	57	LL	0	6	0	1+
30895	M	59	LL	0	6	0	2+
30391	M	62	LL	0	6	+	1+
30753	M	41	LL	0	6	0	2+
30618	F	37	LL	0	6	0	0
30744	M	39	LL	0	6	+	3+
30891	F	25	LL	0	6	+	2+
30900	M	63	LL	0	6	+	2+
30253	M	38	LL	0	6	0	2+
30980	M	30	ENL	0	4	+	3+
30959	F	15	ENL	0	6	0	2+
29882	M	41	ENL	0	3	+	0
30932	M	40	ENL	0	5	+	2+
30974	M	38	ENL	0	6	+	1+
30916	F	36	ENL	0	5	+	0
31162	F	22	ENL	0	3	+	0
30882	M	52	ENL	0	4	+	0
30962	M	38	ENL	0	4	+	0
31000	M	60	ENL	0	4	+	0

MDT=multidrug therapy; IBB=Bacilloscopic index of skin fragment; MOR EPI=μ-opioid receptor in keratinocytes; MOR MAC=μ-opioid receptor in macrophages; *first biopsy of the patient; **second biopsy of the same patient; F=female; M=male; LL=lepromatous leprosy patient; ENL=erythema nodosum leprosum; ++positive; 0=negative. In all cases, MOR MAC staining was granular and cytoplasmic. Immunostain: (-) negative, (+) weakly positive, (++) positive, (+++) strongly positive.

016



macrophages was performed (0 to 3+). Fisher's exact test was considered at a level of significance of 5%.

Ethical approval

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation (certificate number CAAE 61115716.5.0000.5262).

Results

We selected 8 females and 18 male leprosy multibacillary patients, with a median age of 40 years-old (minimum 15; maximum 63). In the reactional group, 10 patients presented ENL before, at the first biopsy; 3 patients during; and 5 patients after multidrug therapy (MDT).

Histopathological evaluation is shown in Figure 1. Analysis of MOR expression in skin cells through immunohistochemistry revealed that in the LL group, a positive stain of 1+ to 3+ was observed in macrophages (Figures 2-5). Forty-six percent of the patients without reactional episodes presented positivity in the epidermis (Figures 2-4). Figure 3 shows a grading transition in the positivity throughout the epidermis in a LL patient.

In the ENL group, 88.9% presented strong staining in epidermis and weak staining in most macrophages (Figures 2,4-5). Among 7 ENL patients in which we evaluated their previous LL biopsy, the MOR staining revealed that three patients that did not present MOR staining in epidermis in the pre-reactional period became positive during ENL diagnosis. Analysis of MOR expression in the epidermis revealed a significant difference between the LL and ENL groups (Figure 2, $p=0,02$).

Discussion

We evaluated the expression of MOR in skin lesion cells from both non-reactional and reactional lepromatous leprosy patients. Epidermal cells from LL patients presented lower

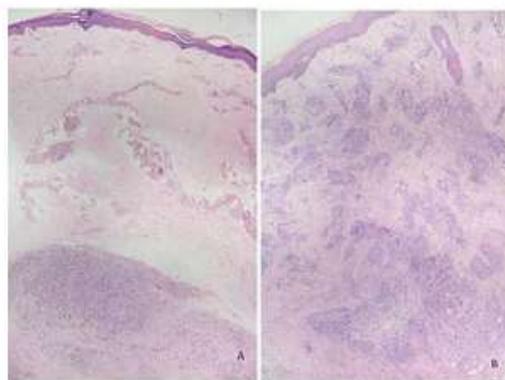


Figure 1: A) LL form with normal epidermis and cluster of macrophages in deep dermis. B) ENL with hyperplasia of epidermis with edema in upper dermis and diffuse inflammatory cells all over the dermis. (Hematoxylin and eosin, 4x).

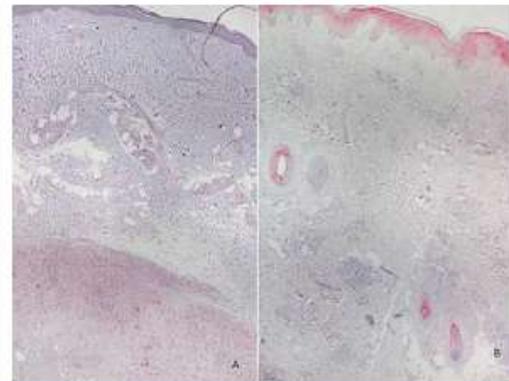


Figure 2: Immunohistochemistry staining with permanent red of μ -Opioid Receptor (MOR) counterstained with hematoxylin. A) LL form with epidermis negative for MOR staining, and macrophages 2+ for MOR staining (4x). B) ENL with hyperplasia of epidermis and MOR staining in epidermis and also in hair follicle epithelial cells. (4x).

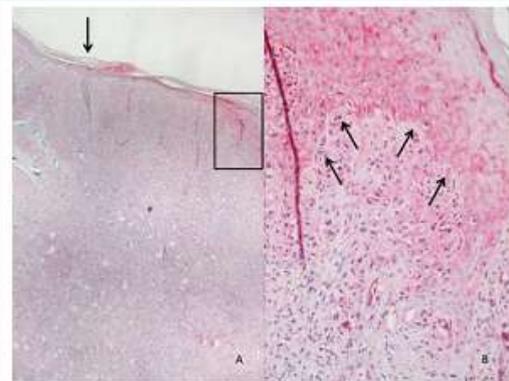


Figure 3: Immunohistochemistry staining with permanent red of μ -Opioid Receptor (MOR) counterstained with hematoxylin. A) Panoramic of LL form with transitional MOR staining on the right side of the arrow, (4x). B) Spot from A with arrows showing limits between epidermis and dermis; MOR staining in epidermis and macrophages (20X).

percentages of staining for MOR comparing to the ENL patients. These data suggest that neural activity from epidermal neuroreceptors, probably through antidromic axon reflexes, produces the release of neuropeptides at the peripheral terminals of the neurons, possibly exacerbating inflammatory responses. This hypothesis is suggested by the demonstration of a transition between atrophy of epidermis without MOR staining, and the epidermis with hyperplasia and MOR staining in the skin lesion of one of the LL patients. This aspect could be interpreted as indirectly showing the in situ release of neuropeptides by neurogenic inflammation activity.

Only few LL patients demonstrated MOR positivity in epidermis. We hypothesize that the positivity for MOR at epidermis of LL was a subclinical reactional episode. In most of them there was association with edema or paresthesia on limbs, possibly reflecting vascular neuropathy by commitment



greatly increased in inflamed tissues [22]. This is due in part to the stimulation of MOR synthesis in the dorsal root ganglia by cytokines and their transport to peripheral terminals. In addition, immune cells, guided to the inflamed region by cell adhesion molecules in inflammatory cells, endothelial cells and keratinocytes are stimulated by local cytokines to secrete endogenous opioid peptides that bind to MOR [23,24].

The authors report immunohistochemistry studies in order to verify the expression of MOR in leprosy multibacillary patients with and without Erythema Nodosum Leprosum (ENL). Data suggest that keratinocytes with nociceptors participate in the ENL episodes, and the opioid system (indirectly shown through MOR demonstration) may act as modulator of neuroinflammation, integrated with nociceptors, Schwann cell, keratinocytes, and endothelial cells probably by the release of neuropeptides, TNF and NGF in an orchestrated way.

Acknowledgements

We would like to thank the leprosy pathology laboratory team for the aid in the immunohistochemical staining.

Sponsorship

This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, Brasil (CAPES), through finance code 001.

References

- Polycarpou A, Walker SL, Lockwood DN (2017) A systematic review of immunological studies of erythema nodosum leprosum. *Front Immunol* 8: 233. [Link: http://bit.ly/2QVAAUV](http://bit.ly/2QVAAUV)
- Cuevas J, Rodríguez-Peralto JL, Carrillo R, Contreras F (2007) Erythema nodosum leprosum: reactional leprosy. *Semin Cutan Med Surg* 26: 126-130. [Link: http://bit.ly/2FrES0J](http://bit.ly/2FrES0J)
- Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, et al. (2012) CD163 favors Mycobacterium leprae survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol* 42: 2925-2936. [Link: http://bit.ly/2SYrhFD](http://bit.ly/2SYrhFD)
- Fachin LR, Soares CT, Belone AF, Trombone AP, Rosa PS, et al. (2017) Immunohistochemical assessment of cell populations in leprosy-spectrum lesions and reactional forms. *Histol Histopathol* 32: 385-396. [Link: http://bit.ly/2N14Lsw](http://bit.ly/2N14Lsw)
- Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, et al. (1999) Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol* 50: 541-549. [Link: http://bit.ly/36vwAkt](http://bit.ly/36vwAkt)
- Moalem G, Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev* 51: 240-264. [Link: http://bit.ly/2Qsfqyt](http://bit.ly/2Qsfqyt)
- Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M (2006) Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoenocrine organ. *Physiol Rev* 86: 1309-1379. [Link: http://bit.ly/2ZV9GAB](http://bit.ly/2ZV9GAB)
- Kraus J (2009) Regulation of mu-opioid receptors by cytokines. *Front Biosci* 1: 164-170. [Link: http://bit.ly/2QsUWWu](http://bit.ly/2QsUWWu)
- Stricker (2018) Mikroskopische Studien über Wachstum und Wechsel der Haaf'e, in: Ebner V (ed) manual of human embryology 24. Sitz. Her. d. K. Akad. d. Wiss., Wien. Cited by: Choi JE, di Nardo A. Skin neurogenic inflammation. *Semin Immunopathol* 40: 249-259.
- Bigliardi-Qi M, Sumanovski LT, Büchner S, Ruffi T, Bigliardi PL (2004) Mu-opiate receptor and beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin. *Dermatology* 209: 183-189. [Link: http://bit.ly/2QQngB3](http://bit.ly/2QQngB3)
- Chiu JM, von Hehn CA, Woolf CJ (2012) Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nat Neurosci* 15: 1063-1037. [Link: http://bit.ly/2s50Jdo](http://bit.ly/2s50Jdo)
- Azuma Y, Ohura K (2002) Endomorphins 1 and 2 inhibit IL-10 and IL-12 production and innate immune functions, and potentiate NK-kappaB DNA binding in THP-1 differentiate to macrophage-like cells. *Scand J Immunol* 56: 260-269. [Link: http://bit.ly/2sJHjt1](http://bit.ly/2sJHjt1)
- Hou YN, Vlaskovska M, Cebers G, Kasakov L, Liljequist S, et al. (1996) A mu-receptor opioid agonist induces AP-1 and NF-kappa B transcription factor activity in primary cultures of rat cortical neurons. *Neurosci Lett* 212: 159-162. [Link: http://bit.ly/2QxonVY](http://bit.ly/2QxonVY)
- Minnone G, de Benedetti F, Bracci-Laudiero L (2017) NGF and its receptors in the regulation of inflammatory response. *Int J Mol Sci* 18: pii: E1028. [Link: http://bit.ly/36qGa89](http://bit.ly/36qGa89)
- Pannell M, Labuz D, Celik MO, Keye J, Batra A, et al. (2016) Adoptive transfer of M2 macrophages reduces neuropathic pain via opioid peptides. *J Neuroinflammation* 13: 262. [Link: http://bit.ly/2MznAwk](http://bit.ly/2MznAwk)
- Karanth SS, Springall DR, Lucas S, Levy D, Ashby P, et al. (1989) Changes in nerves and neuropeptides in skin from 100 leprosy patients investigated by immunocytochemistry. *J Pathol* 157: 15-26. [Link: http://bit.ly/2sJtuZv](http://bit.ly/2sJtuZv)
- Ridley DS, Jopling WH (1966) Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 34: 255-273. [Link: http://bit.ly/36Hky7q](http://bit.ly/36Hky7q)
- The IHC-plus™ Immunohistochemistry Protocol. LSBio. [Link: http://bit.ly/2sWu8VB](http://bit.ly/2sWu8VB)
- Mousa SA, Cheppudira BP, Shaqura M, Fischer O, Hofmann J, et al. (2007) Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. *Brain* 130: 502-513. [Link: http://bit.ly/2tAycKY](http://bit.ly/2tAycKY)
- Pereira RM, Calegari-Silva TC, Hernandez MO, Saliba AM, Redner P, et al. (2005) Mycobacterium leprae induce NF-kappaB-dependent transcription repression in human Schwann cells. *Bioche Biophys Res Commun* 335: 20-26. [Link: http://bit.ly/37FTc10](http://bit.ly/37FTc10)
- Fields HL (2011) Mu opioid receptor mediated analgesia and reward. In: The opiate receptors. Gavril W, Pasternak, editor. New York Dordrecht Heidelberg London: Humana Press Springer 239-264. [Link: http://bit.ly/2SWyR8b](http://bit.ly/2SWyR8b)
- Zhou L, Zhang Q, Stein C, Schafer M (1998) Contribution of opioid receptors on primary afferent versus sympathetic neurons to peripheral opioid analgesia. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 1000-1006. [Link: http://bit.ly/2QylmWV](http://bit.ly/2QylmWV)
- Smith EM (2003) Opioid peptides in immune cells. *Adv Exp Med Biol* 521: 51-68. [Link: http://bit.ly/2NbhW91](http://bit.ly/2NbhW91)
- Stein C, Schafer M, Macheleska H (2003) Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 9:1003-1008. [Link: http://bit.ly/39TxcCE](http://bit.ly/39TxcCE)

Copyright: © 2019 Pignataro PE, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

5. DISCUSSÃO

Opioides e receptores de opioides apresentam assuntos controversos e bem estudados por sua suposta ação imunossupressora. Os estudos prévios foram predominantemente *in vitro*, em doses não fisiológicas, em usuários de opioides, e em casos de neoplasias e neuropatias. Dentre os receptores de opioides, MOR mostrou ter alta afinidade por opiáceos, sobretudo a morfina. A visão de que os opiáceos, através do estudo da expressão de seus receptores, sobretudo MOR, sejam cofatores para proliferação celular tem sido bastante estudada, mostrando forte evidência em estudos de neoplasia, especialmente em câncer de pulmão. Esta condição está associada à expressão de fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor, EGF) e receptor de fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor receptor, EGFR) induzida por MOR (LENNON et al., 2014).

O impacto causado por MOR na inflamação também é bastante estudado, sendo dependente da transcrição de fator nuclear kappa B, o qual é também iniciador de transcrição de citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF (GHOSH et al., 1998).

Este estudo, portanto, foi dividido em inflamação não neurogênica (leishmaniose cutânea e esporotricose) e neurogênica (hanseníase multibacilar).

Inicialmente, o estudo visou principalmente a observação de expressão de MOR em tecidos com reação granulomatosa cutânea, em vários sítios como epiderme, derme e endotélio. A presença de MOR já tinha sido anteriormente demonstrada nestes sítios, porém o estudo de sua expressão em doenças granulomatosas com manifestação Th1 e Th2 é inédita.

Foi realizada uma comparação entre alterações histopatológicas e expressão imunohistoquímica de MOR em úlceras cutâneas dolorosas e indolores de leishmaniose, esporotricose e também em úlceras inespecíficas. Lesões cutâneas ulceradas de leishmaniose e esporotricose não apresentaram diferenças significativas entre aspectos histopatológicos ou intensidade da coloração de MOR ao comparar lesões com presença ou ausência de dor local. No entanto, houve uma marcação mais forte para MOR nas áreas com hiperplasia pseudoepiteliomatosa, um achado ainda não descrito na literatura.

A úlcera de esporotricose apresentou perfil histopatológico semelhante quando comparada à leishmaniose cutânea, exceto pelo maior índice de microabscessos nas lesões em nosso estudo, porém sem diferenças estatísticas em qualquer apresentação de aspectos histopatológicos.

Nestas doenças granulomatosas estudadas (leishmaniose cutânea e esporotricose), MOR apresentou forte intensidade de marcação na epiderme, particularmente nos casos de hiperplasia pseudoepiteliomatosa, o que sugere que os opioides sejam importante co-fator na manutenção do status inflamatório. Seu papel indutor do afluxo de polimorfonucleares principalmente em áreas justapostas à epiderme ou à hiperplasia pseudoepiteliomatosa em derme média e profunda perpetuaria a inflamação, se observarmos a característica de polimorfonucleares de produção de várias citocinas (TECCHIO; MICHELETTI; CASSATELA, 2014). A participação da epiderme na susceptibilidade à leishmaniose foi demonstrada através de polimorfismo de IL-17 (GONÇALVES DE ALBUQUERQUE et al, 2019) e diminuição de IL-6 (EHRCHEN et al., 2010).

Embora leishmaniose cutânea e esporotricose sejam enfermidades com resposta predominantemente Th1 em imunocompetentes, que se manifestam como úlceras e apresentam cronicidade, o aspecto histopatológico das lesões apresenta um perfil Th2, com desorganização granulomatosa. Porém, em torno de 40% observou-se concomitância de células epitelioides e marcação por MOR nestas células. Muito embora estas lesões tenham tido um tempo de evolução médio de 2 meses, não se pode inferir necessariamente que exista imunossupressão nestes casos. Parece haver um desequilíbrio entre as citocinas reguladoras da resposta imune, conforme já assinalado anteriormente por outros autores (MORGADO et al., 2011; MORGADO et al., 2018).

Os queratinócitos nas úlceras, são circundados por infiltração inflamatória sendo estimulados a liberar citocinas e fatores de crescimento, incluindo NGF e opioides. Provavelmente a alta intensidade da protease e peptidase resultantes da atividade inflamatória local degradem mais rapidamente opioides naqueles pacientes que referiam lesões dolorosas. Por outro lado, naqueles pacientes com lesões indolores, uma possível explicação é que a anti-nocicepção veio dos neurônios do GRD.

Opioides produzidos por imunócitos interagindo com receptores de opioides em nervos sensitivos inibem a nocicepção em locais de inflamação. O aumento das quantidades de peptídeos opioides oriundos das células imunes que se infiltram no tecido inflamado resulta da produção de macrófagos, mastócitos, linfócitos, plasmócitos e polimorfonucleares (STEIN et al., 1990). Os opioides também são liberados das células inflamatórias agindo de maneira parácrina no local da lesão, enquanto os receptores opióides são ativados na periferia de nervos e neurônios do GRD em condições dolorosas. Os receptores opioides têm também um papel fundamental na cicatrização de feridas e homeostase. (WANG et al., 2017)

A regulação para mais dos receptores opioides e o acúmulo de células imunes produtoras de peptídeos opioides são detectados no local da lesão nervosa, acompanhados por uma maior atividade antinociceptiva dos agonistas. Peptídeos opioides derivados de células imunes podem bloquear a excitação de nociceptores nos nervos dentro do tecido lesionado, como demonstrado em pacientes cirúrgicos (STEIN et al., 1990).

O fator nuclear kappa B (NF- κ B) é um complexo proteico que controla a transcrição do DNA, produção de citocinas e sobrevivência celular. NF- κ B está envolvido em respostas celulares e desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imune à infecção. Tem sido relatada a transcrição do gene MOR em várias células imunes, incluindo linfócitos T humanos, leucócitos e células dendríticas maduras, induzindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias e TNF. NF- κ B foi identificado como responsável pela expressão de MOR induzida por TNF no gene promotor humano de MOR (KRAUS et al., 2003)

Os queratinócitos são ativos em produzir muitas citocinas que dificultam a resolução do processo inflamatório em úlceras, principalmente IL-8, que sustentam o recrutamento contínuo de neutrófilos. Estas células também produzem outras substâncias que mantêm a inflamação regulada para baixo, estimulando células Th1 como as quimiocinas CXCL9, CXCL10, CXCL11 e as quimiocinas CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 e CXCL8 (IL8), que estão entre a família de quimiocinas angiogênicas. Por outro lado, citocinas derivadas de neutrófilos levam à persistência do processo inflamatório, expressando citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17) ou citocinas anti-inflamatórias, além de fatores angiogênicos ou fibrogênicos (TECCHIO; MICHELETTI; CASSATELLA, 2014).

Nas lesões cutâneas ulceradas de esporotricose e leishmaniose cutânea, a observação de neutrófilos e necrose é muito comum, mesmo na derme mais profunda. Muitas vezes não há nenhuma queixa da dor, mesmo com muitas enzimas e peptidases acidificando o ambiente. Assim, outra explicação além da produção local de opioides deve ser postulada. Alguns autores relataram experimentos em ratos buscando explicações para a dor neuropática, descobriram que MOR vem do GRD através dos nervos periféricos e bloqueia a dor local. NGF regula MOR no GRD. Isto é seguido pelo transporte axonal aumentado do MOR para terminais periféricos do nervo e aumento subsequente de MOR em fibras nervosas dentro da pele. Os efeitos induzidos pela NGF que ocorreram através do GRD às fibras nervosas periféricas e a potencialização da antinocicepção foram revogados pela neutralização da NGF. Isso sugere que a NGF não só contribui para a dor inflamatória, mas também rege a regulação para mais do MOR, resultando em maior suscetibilidade a opioides e melhor controle da dor (MOUSA et al., 2007).

Os estímulos prejudiciais ao tecido ativam nociceptores em corpos celulares primários do GRD. Os terminais centrais dos nociceptores contactam os neurônios de segunda ordem no corno dorsal da massa cinzenta da medula espinhal. Agonistas de MOR inibem diretamente os neurônios transmissores da dor na periferia e no Sistema Nervoso Central. Eles também atuam em circuitos modulatórios descendentes que controlam a transmissão da dor da medula espinhal fornecida pela inervação noradrenérgica do corno dorsal (FIELDS, 2011).

As lesões de hanseníase LL apresentaram um interessante aspecto, por não apresentar marcação de MOR na epiderme, indicando supressão da atividade do fator NF- κ B pelo *M. leprae* em altas concentrações (PEREIRA et al., 2005). Aspecto diverso acontece quando do episódio reacional (ENH) nestes pacientes, quando a marcação de MOR se apresenta intensa, indicação da ativação do fator NF- κ B em queratinócitos e, portanto, ativação de toda cascata de citocinas inflamatórias. Este é um aspecto que pode elucidar um passo a mais na fisiopatogenia do ENH.

Avaliou-se a expressão de MOR em células da lesão de pele dos pacientes não-reacionais multibacilares de forma LL. As células epidérmicas de pacientes com LL apresentaram menores percentuais de coloração para MOR em comparação com os pacientes com ENH. Estes dados sugerem que a atividade neural dos neuroreceptores epidérmicos, provavelmente através dos reflexos antidrômicos do axônio, produz a liberação de neuropeptídeos nos terminais periféricos dos neurônios, possivelmente exacerbando respostas inflamatórias. Esta hipótese é sugerida pela demonstração de uma transição entre a atrofia da epiderme sem coloração de MOR, e a epiderme com hiperplasia e marcação de MOR na lesão de pele de um dos pacientes LL. Este aspecto pode ser interpretado indiretamente como inflamação neurogênica sugerindo a liberação in situ de neuropeptídeos pela atividade do nociceptor.

Apenas poucos pacientes LL não reacionais demonstraram positividade de MOR na epiderme. Levantamos a hipótese de que a positividade para MOR na epiderme de alguns pacientes LL representa um episódio reacional subclínico. Na maioria destes pacientes houve associação com edema ou parestesia nos membros, possivelmente refletindo a neuropatia vascular pelo comprometimento do sistema nervoso autônomo pela inflamação neurogênica. Por outro lado, pacientes com ENH apresentaram forte positividade na epiderme, provavelmente devido à liberação de neuropeptídeos por nociceptores.

Normalmente, os macrófagos do tipo 2, que secretam endorfinas, são mais evidenciáveis nas lesões de LL. Portanto, não se pode estabelecer com certeza se houve uma mudança do fenótipo dos macrófagos, mas a intensidade da expressão de MOR é sugestiva de uma mudança

do perfil metabólico ou pelo menos uma mudança do padrão de citocinas no ENH, em comparação com LL sem reação clínica. É possível que durante o episódio reacional os macrófagos recém-recrutados do ENH se espalhem em derme e subcutâneo, sem MOR pré-formado detectável por imunohistoquímica.

TNF na pele normal é pré-formado e armazenado em mastócitos na derme e, após estimulação, pode ser produzido por uma variedade de células cutâneas, incluindo queratinócitos, células dendríticas dérmicas e células de Langerhans. TNF é uma citocina inflamatória potente e tem sido considerada como um mediador chave nos sintomas inflamatórios locais e sistêmicos observados durante episódios reacionais na hanseníase.

Aferentes sensitivos cutâneos liberam SP e CGRP na epiderme. Estes neuropeptídeos, em seguida, podem se difundir através do espaço intersticial para ligar aos seus receptores na superfície do queratinócito. O receptor neurocinina 1 de queratinócito (NK1) estimula a proliferação celular, a expressão e a secreção de SP e CGRP, que regulam a expressão e secreção de TNF, IL-6 e NGF. Citocinas inflamatórias e NGF secretados por queratinócitos podem induzir mediadores inflamatórios que podem ativar vários componentes celulares do sistema imunológico inato e adaptativo, favorecendo assim o desenvolvimento de doenças inflamatórias da pele (CHOI; DI NARDO, 2018).

Tem sido relatado que a transcrição do gene MOR em várias células imunes, incluindo linfócitos T humanos, leucócitos e células dendríticas maduras, induzem a citocina proinflamatória TNF. NF- κ B foi identificado como responsável pela expressão do gene MOR induzida por TNF no gene promotor de MOR humano. No entanto, MOR parece não ser diretamente responsável pela mudança do perfil das células imunes. Os genes dependentes de NF- κ B são críticos para as respostas biológicas induzidas por opioides das células neuronais, queratinócitos e imunócitos. O promotor de gene MOR pode não ser sequencialmente ativado por NF- κ B, mas parece que o sistema opioide e NF- κ B estão conectados à ativação do NGF (KRAUS et al., 2009).

Citocinas como IL-1 β , TNF e IL-6, envolvidas na inflamação, são promotores da síntese de NGF em uma variedade de tipos de células como neurônios, células de Schwann, mastócitos e queratinócitos. Citocinas inflamatórias podem induzir a síntese de NGF em neurônios e células gliais, bem como em células epiteliais e endoteliais. Por outro lado, NGF induz a produção de MOR. (MOUSA et al., 2007)

O sistema opioide tem sido estudado juntamente com as células imunes, mas com resultados in vitro controversos, talvez dependendo da concentração de opioides. Nossos resultados sugerem que MOR aparece principalmente em condições inflamatórias exacerbadas

(ENH), provavelmente geradas por neurorreceptores na epiderme devido à atividade antidrômica neuronal. Pode causar estímulo endotelial e desencadear um processo inflamatório.

Uma possível explicação para a demonstração de que MOR é mais intensamente encontrado no ENH do que em lesões de pacientes LL sem reação pode ser um nível maior de NGF devido ao dano de fibras durante o processo reacional. Além disso, a baixa expressão de MOR na epiderme das lesões de pacientes com LL sem episódios reacionais pode refletir uma alta concentração de *M. leprae* nas células de Schwann que de alguma forma suprimem a ativação do NF- κ B por meio da repressão do processo inflamatório (PEREIRA et al., 2005).

Alterações neuroquímicas e fisiológicas na pele são geralmente acompanhadas pela ativação do neurônio do GRD e de células gliais. Agonistas como β -endorfina e encefalina reduzem a excitabilidade dos terminais de nociceptores periféricos e inibem a liberação periférica de peptídeos vasoativos desses terminais (FIELDS, 2011). A ação periférica dos agonistas de MOR é aumentada extremamente em tecidos inflamados (ZHOU et al., 1998). Isto é devido em parte à estimulação da síntese de MOR no GRD por citocinas e seu transporte aos terminais periféricos. Além disso, as células imunes, atraídas para a região inflamada por moléculas de adesão celular em células inflamatórias, células endoteliais e queratinócitos, são estimuladas por citocinas locais para secretar peptídeos opióides endógenos que se ligam a MOR (SMITH, 2003; STEIN; SCHAFER; MACHELSKA, 2003).

Estes resultados sugerem que os queratinócitos juntamente com nociceptores participam nos episódios de ENH, e o sistema opióide (mostrado indiretamente através da demonstração de MOR) pode atuar como o modulador da neuroinflamação, de modo integrado com os nociceptores, células de Schwann, queratinócitos e células endoteliais provavelmente pela liberação de neuropeptídeos, TNF e NGF de forma orquestrada.

Novos estudos poderiam ser desenvolvidos para elucidar melhor o papel do sistema opióide na inflamação neurogênica, particularmente no ENH.

6. CONCLUSÕES

1) O estudo do receptor opioide μ em doenças granulomatosas ulceradas da pele (leishmaniose cutânea e esporotricose) não mostrou diferenças entre os pacientes de ambas as doenças que apresentavam ou não dor no local da lesão cutânea. Entretanto, a expressão do receptor opioide μ foi intensa naquelas lesões cutâneas com hiperplasia pseudoepiteliomatosa.

2) Com relação aos pacientes com hanseníase lepromatosa (LL), houve diferença significativa entre pacientes sem episódios reacionais, que apresentaram pouca expressão do receptor opioide μ na epiderme, e aqueles com episódios de reação tipo eritema nodoso hansênico, que apresentaram intensa expressão do receptor opioide μ na epiderme.

7. REFERÊNCIAS

ABDOLI. A, et al. Wound healing in cutaneous leishmaniasis: A double-edged sword of IL-10 and TGF- β . *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. v.51. p.15-, 2017.

ANGST M.S. et al. Cytokine profile in human skin in response to experimental inflammation, noxious stimulation, and administration of a COX-inhibitor: a microdialysis study. *Pain*. v.139, n.1 ,p. 15-27, 2008.

ANTONIO. L.F. et al., *Sporothrix schenckii* Sensu Lato identification in fragments of skin lesion cultured in NNN medium for differential diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v. 87, p. 118-120, 2017.

AZUMA Y, OHURA K. Endomorphin-2 modulates productions of TNF-alpha, IL-1beta, IL-10, and IL-12, and alters functions related to innate immune of macrophages. *Inflammation*, v. 26 n.5 p.223-32. 2002

BANNO T, GAZEL A, BLUMENBERG M. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *The Journal of Biological Chemistry*, .279, n.31, p.32633-42.

BAPTISTA. C et al., *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Experimental Parasitology*, v.121. n.4, p.317-22, 2009.

BARKER J.N. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet*. V.337, n 8735 p.211-4,1991.

BARRAL-NETTO, M. et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*, v. 257 n. 5069 p. 545-8, 1992.

BARROS, M.B., et al. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24 n. 4, p. 633-54, 2011.

BEREZNIUK, I.; FRICKER, L.D. Endogenous Opioids In: The Opiate Receptors. Gavril W. Pasternak Editor. Humana Press Springer New York Dordrecht Heidelberg London 2011 chapter 4 pages.93-120, 2011

BIELINSKA. A., et al. Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides. *Science*. v.250 , n.4983, p.997-1000. 1990.

BIGLIARDI- Qi et al., Different expression of mu-opiate receptor in chronic and acute wounds and the effect of beta-endorphin on transforming growth factor beta type II receptor and cytokeratin 16 expression. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 120, n.1, p. 145-52. 2003.

BIGLIARDI- Qi et al. Characterization of mu-opiate receptor in human epidermis and keratinocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. V.20, n. 885, p.368-71, 1999.

BRAIN et al. Calcitonin generelated peptide is a potent vasodilator. *Nature*, v.313, n.5997, p 54–6, 1985.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Brasília, DF: O Ministério; 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2018. Hanseníase. Disponível em <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/31/2018-004-Hanseniase-publicacao.pdf> acesso 17/ setembro de 2019

BULLPITT P, WEEDON D. Sporotrichosis: a review of 39 cases. *Pathology*, v.10, n.3, p. 249-56, 1978.

BUSCH-DIENSTFERTIG M, STEIN C. Opioid receptors and opioid peptide-producing leukocytes in inflammatory pain--basic and therapeutic aspects. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 24, n. 5, p.683-94, 2010.

CANGUSSÚ S. The endogenous cytokine profile and nerve fibre density in mouse ear *Leishmaniamajor*-induced lesions related to nociceptive thresholds. *Experimental Parasitology*, v.133, n.2 p.193-200. 2013.

CARVALHO M.T. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, v.35, n.6, p. 655-9, 2002.

CARVALHO L.M.V. et al. Sporotrichoid leishmaniasis: a cross-sectional clinical, epidemiological and laboratory study in Rio de Janeiro State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* Jun 1;59: e33. 2017

CHIU I.M, VON HEHN C.A, WOOLF C.J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nature Neuroscience*, v.15, n.8, p. 1063-7, 2012

CHOI JE, DI NARDO A. Skin neurogenic inflammation. *Seminars in Immunopathology*. 40(3): 249-59, 2018.

COTA, G. F.; SOUSA, M. R.; FEREGUETTI, T. O. et al. The cure rate after placebo or no therapy in American Cutaneous Leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, San Francisco, v. 11, n. 2, e.0149697, 2016.

CUEVAS J, et al. Erythema nodosum leprosum: reactional leprosy. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 26(2): 126-30. 2007;

EHRCHEN JM, et al. Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathogens*. 6(4): e1000871, 2010

FACHIN LR, et al. Immunohistochemical assessment of cell populations in leprosy-spectrum lesions and reactional forms. *Histology and Histopathology*. 32(4): 385-396, 2017.

FIELDS HL. Mu Opioid Receptor Mediated Analgesia and Reward. In: *The Opiate Receptors*. Gavril W. Pasternak Editor. Humana Press Springer New York Dordrecht Heidelberg London 2011 chapter 10 pages. 239-264, 2011

FINLEY M.J. et. Opioid and nociceptin receptors regulate cytokine and cytokine receptor expression. *Cellular Immunology*. V.252, n.1-2, p.146-54. 2008.

FREITAS D. F. S. et al. Sporotrichosis in the Central Nervous System caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Clinical Infectious Diseases*. v. 61 p. 663-4, 2015.

GADIANT RA, OTTEN UH. Interleukin-6 (IL-6) - a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Progress in Neurobiology*, v.52, n.5, p.379-90, 1997.

GHOSH S, MAY M.J, KOPP E.B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, v.16, p 225-60, 1998.

GONÇALVES DE ALBUQUERQUE, SDC et al. Study of association of the rs2275913 IL-17A single nucleotide polymorphism and susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Cytokine*. Nov;123:154784, 2019.

HARVIMA I.T, NILSSON G, NAUKKARINEN A. Role of mast cells and sensory nerves in skin inflammation. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia* v.145, n. 2, p.195–204, 2010.

HUA S, CABOT P.J. Mechanisms of peripheral immune-cell-mediated analgesia in inflammation: clinical and therapeutic implications. *Trends in Pharmacological Sciences*. 3, n.9, p. 427-33, 2010.

KARAM M.C et al. In *Leishmania major*-induced inflammation, interleukin-13 reduces hyperalgesia, down-regulates IL-1 β and up-regulates IL-6 in an IL-4 independent mechanism. *Experimental Parasitology*, v.134, v. 2, p. 200-5, 2013.

KARANTH SS, et al. Changes in nerves and neuropeptides in skin from 100 leprosy patients investigated by immunocytochemistry. *Journal of Pathology*. 157(1):15-26, 1989.

KRAUS J, et al. The role of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-regulated transcription of the human mu-opioid receptor gene. *Molecular Pharmacology*, v. 64, n.4, p.876-84. 2003

KRAUS J. Regulation of mu-opioid receptors by cytokines. *Frontiers in Bioscience (Schol Ed)*. V.1, n.1, p.164-70, 2009.

KRESS M Et al. Calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 but not substance P release induced by antidromic nerve stimulation from rat skin in vitro. *Neuroscience*.v.89, n.1, p.303-10. 1999.

LAMONT LA, Tranquilli WJ, Grimm KA. Physiology of pain. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. V.30,n.4, p:703-28,2000 .

LAROCHE J, Sheoran S, Maruyama K, Martino MM. Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Advances in Wound Care (New Rochelle)*. 1;7(7):209-231. 2018

LAWSON.S.N. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, A delta- or A alpha/beta-fibres. *Experimental Physiology*, v. 87 n. 2 p. 239-44, 2002.

LEMBECK F, HOLZER P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* v.310, n.2, p.175–83, 1979.

LENNON FE, et al. The Mu opioid receptor promotes opioid and growth factor-induced proliferation, migration and Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) in human lung cancer. *PLoS One*. Mar 24;9(3):e91577, 2014.

LYSLE D.T. et al. Morphine-induced modulation of immune status: evidence for opioid receptor mediation and compartment specificity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* v.335, p.53-9, 1993.

MAGALHÃES A.V. et al. Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v.28, n.4, p.253-62, 1986.

MAKARENKOVA V.P, et al. Identification of delta- and mu-type opioid receptors on human and murine dendritic cells. *Journal of Neuroimmunology*. V.117, n.1-2, p.68-77, 2001.

MARSDEN P.D, et al . Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v.78, n.4, p.561-2. 1984.

MARTUCCI, C. et al. The purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1 β , interleukin-6, iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice. Pain, v.137, p. 81–95. 2008.

MATHUR NK, et al. Langerhans cell and leprosy. Leprosy in India, v.55, p.22-28, 1983.

MINNONE G, et al . NGF and its receptors in the regularion of inflammatory response.. International Journal of Molecular Sciences 18(5): pii: E1028, 2017.

MISERY L. Skin, immunity and the nervous system. The British journal of dermatology, v.137,n.6, p.843-50, 1997.

MOALEM G, TRACEY DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. Brain research reviews, v.51, n.2, p.240-64, 2006 .

MORAES MO, et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). Scandinavian Joournal of Immunology. 50(5): 541-9, 1999.

MORGADO F.N. et al. The in situ inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis. Medical mycology v.49, n.6, p.612-20, 2011.

MORGADO F.N. et al. Unbalanced inflammatory reaction could increase tissue destruction and worsen skin infectious diseases – a comparative study of leishmaniasis and sporotrichosis. Scientific Reports v. 8, p. 2898, 2018.

MOURA DF, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. European Journal of Immunology. 42(11): 2925-36, 2012.

MOUSA S.A, et al. M. Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. *Brain.*, v.130 (Pt 2) p.502-13,2007.

NINKOVIĆ J, ROY S. Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino Acids.* 45(1):9-24. 2013.

NYLÉN S, EIDSMO L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.34, n.12, p.551-61, 2012.

OLIVEIRA R.B et al. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, v.65, n.3, p. 364-71, 1999.

OYARCE, J.A. et al. Caracterización epidemiológica, clínica y de laboratorio de esporotricosis em pacientes de um hospital de tercer nível em Lima-Peru, entre los años 1991 y 2014. *Revista Chilena de Infectología* V. 33 N. 3 P. 315-21, 2016.

PANNELL M, et al .Adoptive transfer of M2 macrophages reduces neuropathic pain via opioid peptides .*Journal of Neuroinflammation.* 13(1):262, 2016.

PEREIRA RM, et al, Lopes UG. Mycobacterium leprae induce NF-kappaB-dependent transcription repression in human Schwann cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335(1):20-6, 2005.

PINHEIRO RO et al. Innate Immune Responses in Leprosy. *Frontiers Immunology.* Mar 28; 9:518, 2018.

POLYCARPOU A, et al. A systematic review of immunological studies of erythema nodosum leprosum. *Frontiers Immunology.* 13 (8): 233, 2017.

QUINTELLA, L. P. et al. Proposal of a histopathological rule for the differential diagnosis between American tegumentar leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. *The British Journal of Dermatology* v.167, n. 4, p. 837- 46, 2012.

QUINTELLA L.P., PASSOS S.R., VALE A.C.F.; et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. *Journal of cutaneous pathology*, v. 38 n. 1 p. 25-32, 2011.

RAMOS-E-SILVA, M et al. Sporotrichosis. *Clinical Dermatology* v. 25 n. 2, p. 181-7, 2007.

RIDLEY DS, JOPLING WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases* v.34, p.255-73. 1966

RODRIGUEZ-PINTO D, et al. Regulatory T cells in the pathogenesis and healing of chronic human dermal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)* species. *PLoS neglected tropical diseases* v.6 , n.4, :e1627, 2012.

ROGERS, T.J.; PETERSON, P.K. Opioid G protein-coupled receptors: signals at the crossroads of inflammation. *Trends in Immunology*. V. 24, n. 4, p. 116-21, 2003.

ROOSTERMAN D et al. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiological reviews* v.86, n.4, p.1309-79, 2006.

SACERDOTE, P et al. Transient early expression of TNF- α in sciatic nerve and dorsal root ganglia in a mouse model of painful peripheral neuropathy. *Neuroscience letters*, v.436, p. 210–213, 2008.

SCHOLZ, J. WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature Neuroscience*. V.10, p.1361–1368, 2007

SCHUBACH A, BARROS MB, WANKE B. Epidemic sporotrichosis. *Current opinion in infectious diseases* v. 21, n.2, p.129-33, 2008

SCHUBACH, A. O., et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. V. 96, n. 7, p. 987-96, 2001.

SHARP BM, ROY S, BIDLACK JM. Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system. *Journal of Neuroimmunology* v.15, n. 83(1-2) p.45-56, 1998.

SILVEIRA F.T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*.v.31, n.8, p. 423-31, 2009.

SMITH EM. Opioid peptides in immune cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 521: 51–68, 2003

SOMMER C, WHITE F - Cytokines, Chemokines, and Pain, in: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. - *Pharmacology of Pain*. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 279-302. 2010

STÄNDER S. et al. Localization of mu-opioid receptor 1A on sensory nerve fibers in human skin. *Regulatory peptides*. V.31, n. 110(1) p. 75-83. 2002.

STEIN C, et al A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.87, n.15, p. 5935-9, 1990.

STEIN C, SCHAFFER M, MACHELSKA H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nature Medicine* 9(8):1003–1008, 2003.

STEIN, C. New concepts in opioid analgesia. *Expert opinion on investigational drugs* v.27n.10, p.765-775, 2018.

TACHIBANA T, NAWA T. Immunohistochemical reactions of receptors to met-enkephalin, VIP, substance P, and CGRP located on Merkel cells in the rat sinus hair follicle. *Archives of Histology and Cytology*, v.68, n.5, p.383-91, 2005.

TAKAHASHI, M. et al. Cyclooxygenase-2 expression in Schwann cells and macrophages in the sciatic nerve after single spinal nerve injury in rats. *Neuroscience Letter* v. 363, p. 203–206, 2004.

TAKENAKA, M. et al. A Survey of 165 sporotrichosis cases examined in Nagasaki prefecture from 1951 to 2012. *Mycoses*. v. 57 n. 5 p. 294-8, 2014

TANIUCHI M, et al. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *The Journal of Neuroscience*. V.8, n.2. p. 664-81, 1988.

TECCHIO C, MICHELETTI A, CASSATELLA MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Frontiers Immunology*. 5:508, 2014.

TOMINAGA M, OGAWA H, TAKAMORI K. Possible roles of epidermal opioid systems in pruritus of atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology* v.127, n.9, p. 2228-35, 2007.

VÁZQUEZ-BOTET M, SÁNCHEZ JL. Erythema nodosum leprosum. *International Journal of Dermatology* v.26, n.7, p. 436-7, 1987.

VERRI WA JR et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development. *Pharmacology & therapeutics*, v.112 n.1, p.116-38, 2006.

VOOREND CG, POST EB. A systematic review on the epidemiological data of erythema nodosum leprosum, a type 2 leprosy reaction. *PLoS neglected tropical diseases*.v. 3;7(10):e2440, 2013

WALKER S.L.et al. International workshop on erythema nodosum leprosum (ENL)--consensus report; the formation of ENLIST, the ENL international study group. *Leprosy Review*. V.83, n.4, p 396-407, 2012.

WANG Y, et al. Opioids and opioid receptors orchestrate wound repair. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine* , v.185, p.13-23, 2017.

WANG, Z. H. et al. Interleukin10 of red nucleus plays anti-allodynia effect in neuropathic pain rats with spared nerve injury. *Neurochemical research*, v. 37, p. 1811–1819, 2012.

WINTZEN M. et al. Presence of immunoreactive beta-endorphin in human skin. *Experimental Dermatology*, v. 10, n.5, p.305-11, 2001.

ZHANG YQ, et al. Sporotrichosis: clinical and histopathological manifestations. *American Journal of Dermatopathology*. 33(3):296-302 2011.

ZELOVÁ H, HOŠEK J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*. v.62, n.7, p. 641-51, 2013.

ZHOU L, Zhang Q, Stein C, Schafer M. Contribution of opioid receptors on primary afferent versus sympathetic neurons to peripheral opioid analgesia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic* 286 (2): 1000-6. 1998.

8. ANEXOS

Anexo I

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS – FIOCRUZ

COORDENADOR DA PESQUISA: ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH

ENDEREÇO: Av. Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21040-900

TELEFONES (0xx21) 3865-9167 / 3865-9609/ FAX (0xx21) 3865-9541

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

NOME DO VOLUNTÁRIO: _____

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

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

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas como: de que outras maneiras a LTA pode se manifestar? Como se comportam os exames de laboratório antes, durante e após o tratamento? Quais pacientes, mesmo após o tratamento, irão reabrir suas cicatrizes ou irão desenvolver doença dentro do nariz ou na garganta? Que outras doenças parecidas estão sendo confundidas com a LTA e quais exames devem ser utilizados para esclarecimento? Qual o papel dos seres humanos como reservatórios da doença? Quais as melhores formas de tratamento? Que medidas devem ser tomadas para controlar o problema?

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

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

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

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

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

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

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

Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, procure o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - Fiocruz, mesmo fora do seu agendamento. Em caso de necessidade ligue para a Dra Cláudia Maria Valette Rosalino, Dra. Maria Inês Pimentel, Dr. Marcelo Rosandiski Lyra, Dra. Mariza Salgueiro ou Dr. Armando de Oliveira Schubach

nos telefones acima. Caso você apresente qualquer quadro clínico que necessite de internação, a equipe médica providenciará seu leito no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - Fiocruz.

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

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

Procedimentos, exames e testes que serão utilizados:

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

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

O tratamento da LTA em pacientes humanos costuma ser com o medicamento glucantime por via intramuscular (IM), intravenosa (IV) uma injeção ao dia, geralmente, durante um período de 30 dias

contínuos ou com intervalos de descanso. Excepcionalmente, para idosos, pacientes com doenças graves ou que não tolerem o tratamento normal, poderá ser utilizada a via intralesional (IL). O tempo do tratamento poderá ser diminuído ou aumentado conforme a necessidade. Outras opções de tratamento são a anfotericina B (IV) e a pentamidina (IM), ambas injetáveis e necessitando medidas de acompanhamento parecidas com as do glucantime.

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

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

Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais:

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

Ocasionalmente, os testes na pele poderão apresentar uma reação forte com inflamação do local, formação de bolhas e, mais raramente, formação de ferida. Todo o processo costuma regredir dentro de alguns dias a poucas semanas.

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

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

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

Formas de ressarcimento:

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

Benefícios esperados:

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

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

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

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

Nome paciente:

Data

Nome médico:

Data

Nome testemunha¹:

Data

Anexo II - Termo de Consentimento Geral

TERMO DE CONSENTIMENTO GERAL DO ASA

Eu,, declaro que fui orientado(a) pela assistente social do Ambulatório Souza Araújo- Laboratório de Hanseníase – IOC – FIOCRUZ, quanto aos seguintes aspectos da hanseníase: o que é a doença, forma de transmissão, a cura terapêutica; formas clínicas; demonstração dos blisters para tratamento com a PQT/PB 6 doses e PQT/MB 12 doses; mudança temporária da cor da pele pelo efeito da clofazimina (apenas durante o tempo do tratamento específico); principais sintomas em caso de possíveis reações adversas às drogas que compõem a poliquimioterapia (PQT); como identificar o aparecimento de possíveis quadros reacionais hansênicos (reação reversa, eritema nodoso, multiforme, neurite) e como proceder na manifestação de alguma dessas intercorrências. Entendo que a Hanseníase é tratada com poliquimioterapia (PQT), de acordo com a formaclínica (PB ou MB) e que posso apresentar intercorrências e/ou complicações e/ou sequelas decorrentes da doença ou do tratamento e que caso venha a ocorrer algum desses eventos citados, deverei entrar em contato imediato com o ASA, **através dos telefones 2598-4286 ou 2270-8747, de 2ª à 6ª feira, no horário de 9:00 às 15:30 minutos ou comparecer diretamente para ser atendido em caso de urgência.** Fui orientado (a) também sobre a importância do exame familiar, visando o diagnóstico precoce e o controle da doença, bem como quanto aos deveres com relação à regularidade no tratamento e ao auto-cuidado (caso apresente alguma incapacidade física). Fui esclarecido (a) sobre os direitos trabalhistas, previdenciários e benefícios sociais para pessoas portadoras de hanseníase, como por exemplo: **Vale Social e Riocard.** Fui incentivado (a) manter os vínculos da rede de apoio (família, religião, grupos sociais) e empregatício, como forma de auxiliar-me no enfrentamento da doença. Recebi a cartilha a qual me foi apresentada pela assistente social, que incentivou a leitura da mesma, como complemento das informações passadas no momento da entrevista inicial. Ao final, fui esclarecido (a) quanto ao preenchimento, da Ficha sócio-econômica, contendo meus dados pessoais, sócio-econômicos e epidemiológicos. Recebi esclarecimento,

Rio de Janeiro,de de 20.....

Assinatura do (a)paciente ou responsável

Assinatura da Assistente Social

Anexo III - Termo de Compromisso e Responsabilidade

TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Nós, Patrícia Pignataro, aluna de doutorado, Maria Inês Fernandes Pimentel, orientadora, e Leonardo Pereira Quintella, orientador do projeto de pesquisa intitulado “Estudo imunohistoquímico da expressão tecidual de PGP 9,5 e citocinas relacionadas à dor nas lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar americana, esporotricose e hanseníase tuberculoide”, comprometemo-nos a manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto.

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

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

Rio de Janeiro, 21 de março de 2016.

Patrícia Pignataro

Maria Inês Fernandes Pimentel

Leonardo Pereira Quintella

ANEXO IV - Parecer consubstanciado do CEP/INI

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo imunohistoquímico da expressão tecidual de PGP 9,5 e citocinas relacionadas à dor nas lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar americana, esporotricose e hanseníase tuberculóide

Pesquisador: Maria Inês Fernandes Pimentel

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 61115716.5.0000.5262

Instituição Proponente: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.976.958

Apresentação do Projeto:

Pacientes com leishmaniose cutânea ou esporotricose frequentemente apresentam características epidemiológicas e clínicas semelhantes, o que dificulta o diagnóstico diferencial entre as duas enfermidades no estado do Rio de Janeiro, em que ambas as endemias coexistem. Entretanto, um aspecto clínico chama a atenção: embora as lesões ulceradas possam ser muito similares, a dor está frequentemente presente nas lesões de esporotricose, e geralmente ausente nas lesões de leishmaniose cutânea. A hanseníase tuberculóide constitui enfermidade paradigmática com ausência de dor na presença de infiltrado inflamatório granulomatoso nas lesões.

Objetivos: Através do presente estudo pretende-se comparar a arquitetura e a expressão tecidual por imunohistoquímica do marcador neural PGP 9,5 e de citocinas pró- e anti-inflamatórias em lesões de leishmaniose cutânea típica e esporotricóide, esporotricose linfocutânea e fixa ulcerada, e hanseníase tuberculóide. **Material e métodos:** Fragmentos de lesões cutâneas obtidos por procedimento de biópsia quando da realização dos exames para diagnóstico de pacientes atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), e de pacientes atendidos no Ambulatório Souza Araújo, Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, entre 2000 e 2015, e

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação de Pesquisa: 1.576.955

estocados nos respectivos serviços de Anatomia Patológica, serão submetidos à análise histológica e imunohistoquímica. Serão descritos e comparados a arquitetura e expressão tecidual de citocinas pró- e anti-inflamatórias e PGP 9,5 nas lesões de leishmaniose cutânea, esporotricose e hanseníase tuberculóide, e relacionados à presença ou ausência de dor nas lesões. Resultados esperados: Espera-se que haja diferenças na arquitetura e na expressão tecidual de citocinas pró- e anti-inflamatórias, bem como de PGP 9,5, entre lesões cutâneas das diferentes formas de leishmaniose cutânea e de esporotricose, bem como entre estas e as lesões de hanseníase tuberculóide, e que estas diferenças se correlacionem com a presença ou ausência de dor nas lesões.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Comparar a apresentação histológica, a expressão tecidual de citocinas pró- e anti-inflamatórias e o comprometimento neural dérmico em lesões hipostésicas de LC e hiperestésicas de esporotricose, tendo a hanseníase tuberculóide como modelo de lesão hipostésica.

Objetivo Secundário:

- Comparar aspectos da arquitetura tecidual das lesões ulceradas de pacientes com LC típica ou esporotricose fixa, e de lesões de pacientes com hanseníase tuberculóide- Comparar a expressão tecidual de PGP 9,5 e citocinas pró- e anti-inflamatórias de lesões ulceradas de LC típica ou esporotricose fixa, e de lesões de hanseníase tuberculóide- Comparar aspectos da arquitetura tecidual das lesões ulceradas de pacientes com LC esporotricóide ou esporotricose linfocutânea, e de lesões de hanseníase tuberculóide- Comparar a expressão tecidual de PGP 9,5 e de citocinas pró- e anti-inflamatórias de lesões ulceradas de leishmaniose esporotricóide ou de esporotricose linfocutânea, e de lesões de hanseníase tuberculóide
- Comparar a expressão tecidual de PGP 9,5 e de citocinas pró- e anti-inflamatórias em pacientes com lesão cutânea de LC, esporotricose e hanseníase tuberculóide, em relação à nocicepção e de acordo com a forma clínica (LC típica ou esporotricóide; esporotricose linfocutânea ou fixa ulcerada).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Por se tratar de estudo retrospectivo, existe o risco de confidencialidade dos dados. Os orientadores e a aluna se comprometem através de termo próprio a manter a confidencialidade e a privacidade dos participantes do estudo.

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Marquinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9505

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.576.958

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de importante relevância para caracterização diferencial de lesões ulcerativas causadas por diferentes agentes patogênicos em área endêmica e de coexistência.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados o projeto completo, folha de rosto, informações básicas sobre o projeto, termo de dispensa de TCLE, termo de biorepositório tanto do INI como IOC

Recomendações:

Como recomendação, sugere-se alterar as datas do cronograma, visto que a utilização do material, segundo o cronograma, é anterior à apreciação do projeto pelo cep, como já mencionado na primeira análise e não corrigido até então. Vide informações básicas do projeto

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências do projeto foram sanadas e não há mais inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_738805.pdf	15/02/2017 13:14:43		Aceito
Outros	Carta_Anuencia_IOC.pdf	15/02/2017 13:12:51	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	PedidoDispensaTCLE_18nov16assin_escan.docx	15/02/2017 13:11:28	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Outros	Projeto_Ultima_Versao_18out16.docx	18/10/2016 15:18:18	Lêa Ferreira Camillo Coura	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPatricia27jul16.docx	27/07/2016 15:49:41	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Outros	DeclaracaoMaterialBiologico_AssinadaEscaneada.docx	22/06/2016 15:47:01	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biotenço	TermoBiorepositorioIOC_AssinadoEscaneado.docx	22/06/2016 15:33:56	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Declaração de Manuseio Material	TermoBiorepositorioAssinadoEscaneado.docx	22/06/2016 15:30:59	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito

Endereço: Avenida Brasil 4365
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3865-9585 E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.878.958

Biológico / Biorepositório / Biobanco	TermoBiorepositorioAssinadoEscanead o.docx	22/06/2016 15:30:59	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRostoAssinadaEscaneada.docx	22/06/2016 15:28:15	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 22 de Março de 2017

Léa Ferreira Camillo Coura

Assinado por:
Léa Ferreira Camillo Coura
(Coordenador)

Dr. Léa Ferreira Camillo Coura
Coordenador do Comitê de Bioética
FIOCRUZ
Másc. 52291-00709630
INI/FIOCRUZ

Endereço: Avenida Brasil 4365
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3865-9585 E-mail: cep@ini.fiocruz.br