



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

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

ROSSINA PEREIRA E PEREIRA

**ESTUDO COMPARATIVO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DA
RESPOSTA IMUNE *IN SITU* ENTRE PACIENTES COM FORMA
CUTÂNEA LOCALIZADA E FORMA CUTÂNEA DISSEMINADA DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATENDIDOS NO
LABORATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA E VIGILÂNCIA EM
LEISHMANIOSES, 1989 A 2014.**

Rio de Janeiro

2017

DISSERTAÇÃO MPCDI - INI/ FIOCRUZ R.P. PEREIRA 2017

ROSSINA PEREIRA E PEREIRA

ESTUDO COMPARATIVO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DA
RESPOSTA IMUNE *IN SITU* ENTRE PACIENTES COM FORMA
CUTÂNEA LOCALIZADA E FORMA CUTÂNEA DISSEMINADA DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATENDIDOS NO
LABORATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA E VIGILÂNCIA EM
LEISHMANIOSES, 1989 A 2014.

Dissertação apresentada ao curso Pós-Graduação
em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas e
Parasitárias do Instituto Nacional de Infectologia
Evandro Chagas – INI – Fiocruz – para obtenção do
grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Prof. Dra. Fátima Conceição-Silva e
Prof. Dr. Marcelo Rosandiski Lyra

Rio de Janeiro

2017

ROSSINA PEREIRA E PEREIRA

**ESTUDO COMPARATIVO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DA
RESPOSTA IMUNE *IN SITU* ENTRE PACIENTES COM FORMA
CUTÂNEA LOCALIZADA E FORMA CUTÂNEA DISSEMINADA DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATENDIDOS NO
LABORATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA E VIGILÂNCIA EM
LEISHMANIOSES, 1989 A 2014.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós
Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas e Parasitárias do Instituto
Nacional de Infectologia Evandro Chagas –
INI – Fiocruz – para obtenção do grau de
Mestre em Ciências

Orientadores: Prof. Dr^a. Fátima Conceição- Silva
Prof. Dr^o. Marcelo Rosandiski Lyra

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Fernanda Nazaré Morgado (IOC – FIOCRUZ)

Maria Inês Fernandes Pimentel (INI – FIOCRUZ)

Aline Fagundes da Silva (INI – FIOCRUZ)

Liliane de Fátima Antônio (INI – FIOCRUZ)

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais, meus sogros e ao meu marido por me apoiarem em todos os momentos.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos.”

(Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora por guiarem o meu caminho.

À minha família por compreender minha ausência e ansiedade.

À minha orientadora Dr^a Fátima Conceição Silva por ter me aceitado nesse trabalho, por todo ensinamento e por nunca desistir dos seus alunos, mesmo diante das dificuldades do dia a dia.

Ao meu co-orientador e professor Marcelo Lyra pela franqueza, apoio, ensinamentos e amizade.

À Dr^a Maria Inês Fernandes Pimentel pela ternura, ajuda e disponibilidade.

À Dr^a Fernanda Morgado pela paciência e pela grande contribuição nesse projeto desde os primeiros seminários. Obrigada pela revisão criteriosa e pelas sugestões preciosas.

À Dr^a Raquel de Vasconcellos pelas aulas maravilhosas e pela imensa ajuda.

Às amigas Amanda Seba, Elizabeth Ghezzi, Jéssica Leite, Kissila Costa, Aline Renzetti, por termos formado uma família e por toda ajuda, carinho, amizade e incentivo. Agradeço em especial à Jéssica pelo auxílio incansável em todas as etapas desse trabalho.

À secretária Priscilla Sá pela ajuda, disponibilidade e carinho.

Aos meus amigos de turma pelo companheirismo.

Às doutoras Aline da Silva Fagundes e Liliane de Fátima Antônio por terem aceitado fazer parte da banca.

Aos pacientes, a razão de todo esse projeto.

A todos os funcionários do LapClinVigileish e do Laboratório de Imunoparasitologia.

PEREIRA, R.P. **Estudo comparativo das características clínicas e da resposta imune *in situ* entre pacientes com forma cutânea localizada e forma cutânea disseminada da Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, 1989 a 2014.** Rio de Janeiro, 2017. 95f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

RESUMO

A leishmaniose cutânea disseminada (LDi) caracteriza-se por um número elevado (≥ 10) de lesões cutâneas, polimórficas, em vários segmentos corporais, podendo ou não atingir mucosas. A eficácia do tratamento específico é motivo de controvérsia. Apesar de dados já publicados, questões relativas às características clínicas, à resposta terapêutica e ao perfil imunológico dos pacientes, quando comparados com os pacientes com a forma cutânea localizada com lesão única de LTA, permanecem a ser respondidas. Neste contexto, estudamos uma coorte histórica de pacientes com LDi atendidos no LapClinVigileish (INI-Fiocruz) entre 1989 e 2014. Os pacientes com diagnóstico de LDi (n=17) foram comparados com pacientes apresentando forma cutânea localizada (LCL - n=34). Foi realizado levantamento de dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos, e estudo imunológico *in situ* no qual se avaliou a presença de células CD4⁺, CD8⁺, CD68⁺, mastócitos, neutrófilos, células NK, Ki67⁺, CD25⁺, expressão de NOS2 e amastigotas em fragmentos de lesões cutâneas coletadas no momento do diagnóstico. A confirmação diagnóstica foi realizada por histopatologia e imuno-histoquímica. Os pacientes de LDi eram predominantemente do sexo masculino, com frequente acometimento de cabeça e de mucosas. Não houve diferenças na positividade de exames parasitológicos, IDRM e sorologia entre os dois grupos. Apesar do maior número de casos de insucesso terapêutico primário nos casos de LDi, todos os pacientes obtiveram cura das lesões após repetição ou modificação do esquema terapêutico. Os estudos *in situ* demonstraram semelhanças nas concentrações de células CD8⁺, Ki67⁺, macrófago, neutrófilo, NK e expressão de NOS2 nos dois grupos. No entanto, LCL apresentou maior concentração de células CD4⁺ e mastócitos, enquanto LDi apresentou maior número de células CD25⁺. Como conclusão, obtivemos algumas características clínicas e do processo inflamatório que diferiram quando LCL e LDi eram comparados. No entanto, nenhum deles foi suficiente, isoladamente ou em conjunto, para distinguir de forma clara LCL de LDi. Baseado na literatura que reporta dificuldade de curar a LDi o Ministério da Saúde recomendou recentemente aumentar o tempo de administração e a dose de antimoniato de meglumina para esta forma de doença. Por este motivo, os profissionais de saúde devem ser capazes de reconhecer e tratar a LDi de forma adequada.

Palavras-chave: LTA, leishmaniose disseminada, leishmaniose cutânea localizada, características clínicas, imuno-histoquímica, resposta imune *in situ*.

PEREIRA, R.P. **Comparative study of the clinical characteristics and the *in situ* immune response between patients presenting localized and disseminated cutaneous form of American Cutaneous Leishmaniasis treated at the Laboratory of Clinical Research and Surveillance in Leishmaniasis, 1989 to 2014.** Rio de Janeiro, 2017. 95f. Dissertation [Master's Degree in Clinical Research in Infectious Diseases] - Evandro Chagas National Institute of Infectology, Oswaldo Cruz Foundation.

ABSTRACT

The disseminated cutaneous form of leishmaniasis (LDi) is characterized by a high number (≥ 10) of polymorphic cutaneous lesions spread in several body segments, with or without mucosal lesions. The response to specific treatment is controversial. Despite the literature information, questions related to the clinical characteristics, therapeutic response and the immunological profile of these patients remain to be answered, mostly when they are compared with the profile of patients with a unique localized cutaneous form of ACL. In this context, we evaluated a historical cohort of patients with LDi followed by LaPClinVigileish (INI-Fiocruz) between 1989 and 2014. Patients with a diagnosis of LDi ($n = 17$) were compared to patients presenting localized cutaneous form (LCL = 34). In addition to clinical, laboratory and epidemiological data, we performed an *in situ* immunological study to evaluate the quantity of CD4⁺, CD8⁺, CD68⁺ cells, mast cell, neutrophil, NK cells, Ki67⁺, CD25⁺ cells, NOS2 expression and amastigotes on fragments of cutaneous lesions collected during diagnosis. The diagnostic confirmation was done by histopathology and immunohistochemistry. The LDi patients were predominantly male, with frequent involvement of the head and mucous membranes. There was no difference in the positivity of parasitological exams, IDRMs and serology between the two groups. Despite the greater number of cases of primary therapeutic failure in LDi, all patients were cured after repeated 1-3 cycles of treatment or after treatment adjustment. *In situ* studies showed similarities in CD8, Ki67, macrophage, neutrophil, NK and NOS2 concentrations when the two groups were compared. However, LCL exhibits the highest concentration of CD4⁺ cells and mast cells, while LDi had the highest number of CD25⁺ cells. These results alone are not enough to suggest an increase of the *in situ* inflammatory activity in either group. Other markers should be evaluated in order to better verify the characteristics of the *in situ* inflammatory process which could be involved in the development of LDi. In conclusion, we obtained some clinical and inflammatory characteristics that differed when LCL and LDi were compared. However, they are not sufficient, either alone or in combination, to clearly separate LCL from Ldi. The literature reports a possibility of difficulty in healing LDi, so health professionals should be aware during the follow up and the therapeutic response in LDi to intervene early and correct the therapeutic scheme used if necessary.

Key words: LTA, disseminated leishmaniasis, localized cutaneous leishmaniasis, clinical characteristics, immunohistochemistry, *in situ* immune response

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Casos notificados de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil, 1980 a 2015	2
Figura 2 - Casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) por regiões brasileiras, 1980 a 2015	2
Figura 3 – Classificação clínica das Leishmanioses no Brasil segundo Marzochi & Marzochi (1994)	4
Figura 4 - Lesão típica de leishmaniose cutânea localizada: úlcera de bordas regulares, elevadas e de fundo granuloso	5
Figura 5 - Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar americana. Leishmaniose cutânea disseminada (LDi): lesões polimórficas tipo placas infiltradas ulceradas distribuídas em todo corpo.	8
Figura 6- Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar americana. Leishmaniose cutânea disseminada (LDi): lesões tipo placa eritematosa, infiltradas, ulceradas acometendo face (A), mãos e abdome (B).	8
Figura 7 - Fisiopatogenia da leishmaniose tegumentar americana (MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, 2017)	11
Figura 8 - Ação das enzimas óxido nítrico sintase (NOSII) e arginase em macrófagos como modulador de seu efeito em tripanossomatídeos (VINCENDEAU <i>et al</i> , 2003)	21
Quadro 1 – Marcadores celulares e funcionais avaliados no presente estudo	31
Figura 9 - Fluxograma de inclusão de pacientes e etapas do estudo (Estudo comparativo das características clínicas e da resposta imune <i>in situ</i> entre pacientes com forma cutânea localizada e forma disseminada da leishmaniose tegumentar americana atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, 1989 a 2014)	33
Quadro 2 - Características das lesões dos pacientes de LDi e LCL	35
Quadro 3 - Distribuição dos resultados dos exames diagnósticos utilizados para cada paciente com LTA	38

Figura 10 - Avaliação da resposta inflamatória *in situ* por imuno-histoquímica no grupo LDi e grupo LCL. Marcações positivas em castanho-enebecido (setas). (A) e (B) células T CD4. (C) e (D) células T CD8. (E) e (F) Neutrófilos. (A) e (B) Barra de aumento: 50 µm; (C) a (F) Barra de aumento: 10 µm. **44**

Figura 11 - Avaliação da resposta inflamatória *in situ* por imuno-histoquímica no grupo LDi e grupo LCL. Marcações positivas em castanho-enebecido (setas). (A) e (B) Mastócitos. (C) e (D) células NK. (E) e (F) Ki67. (A), (B), (E) e (F) Barra de aumento: 10 µm; (C) e (D) Barra de aumento: 50 µm. **45**

Figura 12: Contagem percentual dos marcadores estudados nas lesões cutâneas de leishmaniose cutânea disseminada (LDi) em comparação às de leishmaniose cutânea localizada (LCL). (A) CD4, (B) CD8, (C) CD25 e (D) KI67. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. **47**

Figura 13: Contagem percentual dos marcadores estudados nas lesões cutâneas de leishmaniose cutânea disseminada (LDi) em comparação às de leishmaniose cutânea localizada (LCL). (A) macrófagos, (B) mastócitos, (C) neutrófilos e (D) NK. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. **48**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição das características de lesão nos casos de LTA de acordo com o tipo de acometimento	37
Tabela 2 – Distribuição da positividade dos exames usados para o diagnóstico de LTA nos pacientes estudados de acordo com a forma clínica	41
Tabela 3 – Número de exames parasitológicos positivos de acordo com a forma clínica de LTA	41
Tabela 4 - Resposta ao tratamento nos dois grupos avaliados constituídos por pacientes apresentando leishmaniose cutânea disseminada (LDi) e leishmaniose cutânea localizada. INI – FIOCRUZ – 1989 a 2014	43
Tabela 5 – Distribuição da resposta terapêutica inicial nos casos de LTA avaliados constituídos por pacientes apresentando leishmaniose cutânea disseminada (LDi) e leishmaniose cutânea localizada. INI – FIOCRUZ – 1989 a 2014	43
Tabela 6 – Contagem percentual dos marcadores estudados nos sítios de lesões cutâneas do grupo de leishmaniose cutânea disseminada (LDi) em comparação ao grupo de leishmaniose cutânea localizada (LCL).	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC	Anticorpo
AEC	Amino etilcarbazol (<i>Amynoethyl carbazole</i>)
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency syndrome</i>)
AM	Antimoniato de meglumina
BALB/C	Linhagem de camundongos susceptíveis à maioria das espécies de <i>Leishmania</i> que desenvolvem infecção no modelo murino
BCR	Receptor de células B
C57BL/6	Linhagem de camundongos resistentes à maioria das espécies de <i>Leishmania</i>
CD	Grupo de diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>)
CEP-INI	Comitê de Ética em Pesquisa do INI
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
gp	Glicoproteína
Gp63	Glicoproteína 63
HE	Hematoxilina eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>human immunodeficiency virus</i>)
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina -13
IL-17	Interleucina-17
IL-2	Interleucina -2
IL-22	Interleucina-22
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IFN- γ	Interferon gama
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
Ki67	Proteína nuclear associada à proliferação celular
LapClinVigileish	Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses
LC	Leishmaniose cutânea
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCD	Leishmaniose cutânea difusa

LDi	Leishmaniose cutânea disseminada
LIP	Laboratório de Imunoparasitologia
LM	Leishmaniose mucosa
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal (<i>Main histocompatibility complex</i>)
MS	Ministério da Saúde
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NK	Célula <i>natural killer</i> (matadoras naturais)
NNN	Meio Novy, MacNeal, Nicolle
NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
NOS2	Óxido nítrico sintase do tipo 2 (<i>Nitric oxide synthase 2</i>)
NKT	<i>Natural Killer T cell</i>
OCT	<i>Optimal cutting temperature</i>
PBS	Solução salinada fosfatada tamponada (<i>Phosphate buffered solution</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RPL	Resposta proliferativa primária de linfócitos
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
T CD4 ⁺	Linfócito T CD4
T CD8 ⁺	Linfócito T CD8
T reg	Linfócitos T reguladores
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	Receptor de células T (<i>T cell receptor</i>)
TGF-β	Fator de crescimento tumoral beta (<i>Transforming growth factor-beta</i>)
Th	Célula T auxiliar (<i>T helper lymphocyte</i>)
Th1	Linfócito T auxiliar 1 (<i>T helper 1 lymphocyte</i>)
Th17	Linfócito T auxiliar 17 (<i>T helper 17 lymphocyte</i>)
Th2	Linfócito T auxiliar 2 (<i>T helper 2 lymphocyte</i>)
TNF-α	tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor-alfa</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 DOENÇA E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NO BRASIL.....	1
1.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)	3
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LTA.....	4
1.3.1 Leishmaniose Cutânea (LC)	4
1.3.2 Leishmaniose Mucosa (LM)	6
1.4 LEISHMANIOSE CUTÂNEA DISSEMINADA (LDi)	6
1.5 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA LTA	9
1.6 ASPECTOS HISTOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS LDi <i>versus</i> LCL	12
1.7 DIAGNÓSTICO.....	15
1.8 TRATAMENTO.....	17
1.9 ESTUDOS <i>IN SITU</i> NA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA LTA	19
1.9.1 Linfócitos e suas subpopulações	19
1.9.2 CD68 (Macrófagos), NOS2 (óxido nítrico sintase do tipo 2)	20
1.9.3 Elastase Neutrófila (Neutrófilos e precursores de neutrófilos)	21
1.9.4 Triptase de mastócitos	21
1.9.5 CD56 (Células natural killer – NK)	22
1.9.6 Ki67	22
1.9.7 CD25	23
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVO	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	27
4.2 ASPÉCTOS ÉTICOS.....	27
4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO	28
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	28
4.4.1 Critérios de Inclusão – Estudo 1 (clínico-laboratorial)	29
4.4.2 Critério de Inclusão – Estudo 2 (estudo <i>in situ</i>)	29
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	29
4.6 ESTUDO CLÍNICO LABORATORIAL (ESTUDO 1)	29
4.7 ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA <i>IN SITU</i> (ESTUDO 2)	30
4.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS	32
5 RESULTADOS	33

5.1 AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E DE RESPOSTA AO TRATAMENTO DOS GRUPOS ESTUDADOS	34
5.2 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES CELULARES E FUNCIONAIS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA <i>IN SITU</i> DAS LESÕES DE LTA	44
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	56
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS	
Anexo I – Termo de consentimento livre e esclarecido	68
Anexo II – Formulário de coleta de dados	69
Anexo III – Parecer de aprovação do CEP – INI/FIOCRUZ	74
Anexo IV– Termo de compromisso e responsabilidade	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NO BRASIL

As leishmanioses são antropozoonoses que constituem importante problema de saúde pública devido a sua alta incidência, ampla distribuição geográfica, diversidade de agentes etiológicos, reservatórios, vetores de transmissão e formas clínicas (BRASIL, 2017).

As leishmanioses são divididas em leishmaniose tegumentar (LT) que pode afetar a pele e/ou mucosas, notadamente de vias aerodigestivas superiores, e leishmaniose visceral (LV) que acomete órgãos e tecido do sistema linfohematopoiético. Ambas são transmitidas ao ser humano pela picada de fêmeas infectadas de insetos da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia*, genericamente denominados flebotomíneos (BRASIL, 2017). Para diferenciar as formas clínicas do Velho e Novo Mundo, conveniou-se denominar as LT e LV que ocorrem no continente americano de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA).

No Brasil, a LTA é encontrada em todos os estados sendo considerada um importante problema de saúde pública no país, tanto por sua distribuição/número de casos, como pela potencial ocorrência de lesões deformantes que podem ocasionar graves repercussões psicológicas (BRASIL, 2017).

No estado do Rio de Janeiro, a LTA é causada quase exclusivamente pelo protozoário *Leishmania (Viannia) braziliensis*, cuja transmissão depende principalmente da adaptação do vetor *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* ao ambiente domiciliar e peridomiciliar (MARZOCHI & MARZOCHI 1994).

O número de casos de LTA no território brasileiro pode sofrer variações de acordo com o período (Figura 1) e a região (Figura 2). Segundo dados do Ministério da Saúde (MS), em 2015 foram detectados 19.395 casos de LTA no Brasil. Neste mesmo ano a taxa de detecção da doença em nosso país foi de 9,5 casos/100.000 habitantes, com as maiores taxas detectadas nas Regiões Norte (51,1 casos/100.000), Centro-Oeste (19,0 casos/100.000 habitantes) e Nordeste (9,1 casos/100.000) (BRASIL/SINAN 2017).

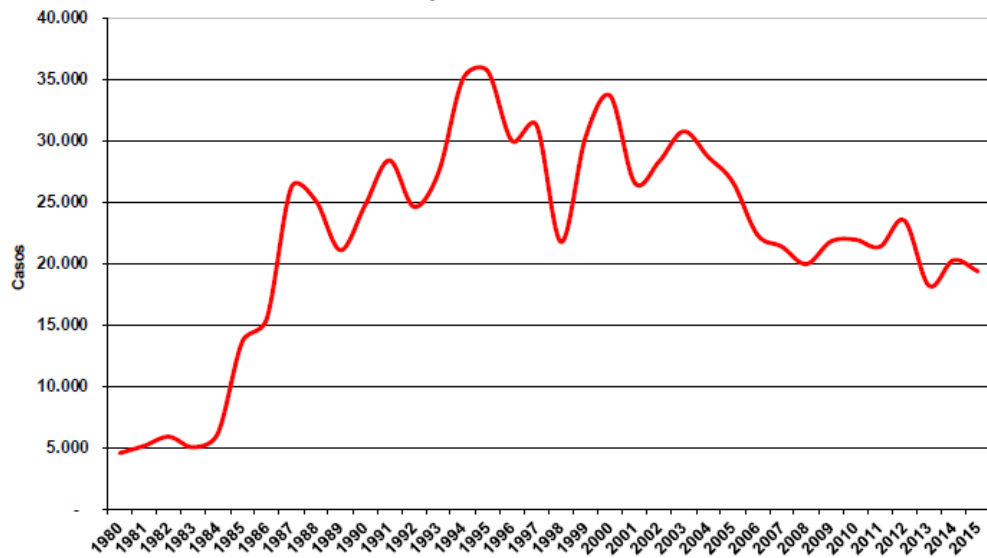


Figura 1 – Casos notificados de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil, 1980 a 2015

Fonte: MS/SINAN (<http://portalsaude.saude.gov.br>)

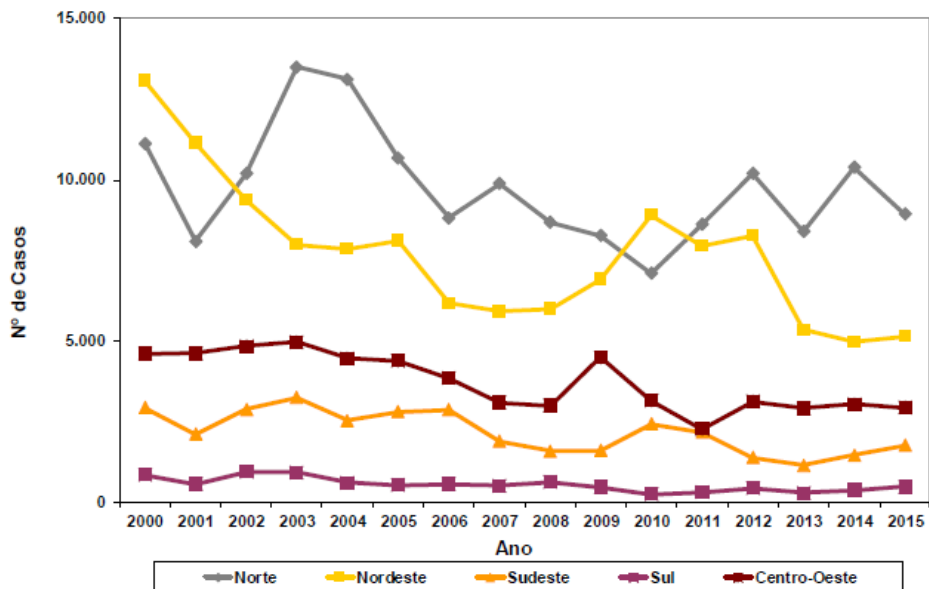


Figura 2 - Casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) por regiões brasileiras, 1980 a 2015

Fonte: MS/SINAN (<http://portalsaude.saude.gov.br>)

1.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

A LTA é uma doença infecciosa, não contagiosa causada por diferentes espécies do protozoário de gênero *Leishmania* que durante seu ciclo de vida assume duas formas distintas: forma promastigota, flagelada, que é a forma infectante, presente no tubo digestivo do inseto transmissor; e a forma amastigota, sem flagelo livre, parasito intracelular obrigatório dos tecidos do hospedeiro vertebrado. Apesar de poder ser encontrado no interior de diferentes tipos celulares, tem tropismo pelas células do sistema fagocítico mononuclear, sendo o macrófago a principal célula alvo.

Nas Américas, 11 espécies de *Leishmania* foram identificadas como agentes causais de LTA em ambos os subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). No entanto, no Brasil, segundo o Ministério da Saúde, sete espécies foram encontradas e as três principais são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A *L. (V.) braziliensis* é o agente mais frequentemente encontrado no Brasil (SCHUBACH *et al.* 1998; BRASIL, 2017).

O parasito é identificado em animais silvestres e domésticos, sendo que não há evidências científicas que comprovem o papel destes últimos como reservatório, sendo considerados como hospedeiros acidentais.

A transmissão ocorre de um animal infectado para o homem através da picada do inseto vetor de gênero *Lutzomyia* spp, cujas espécies envolvidas dependem da localização geográfica. Durante a hematofagia o inseto vetor injeta saliva contendo formas promastigotas metacíclicas que são então internalizadas por fagócitos e se transformam na forma amastigota, característica do parasitismo. No entanto, mais recentemente, tem sido discutida a possibilidade de transmissão inter-humana (ROSALES-CHILAMA *et al.*, 2015)

O período de incubação no ser humano é em média de 2 a 3 meses, podendo variar de 2 semanas a 2 anos (BRASIL, 2017).

1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LTA

Classicamente a LTA apresenta duas formas clínicas principais: mucosas e cutâneas. O quadro clínico da LTA depende não somente da espécie do parasito, mas também da resposta imune do hospedeiro, principalmente a resposta imune mediada por células.

Outros fatores que afetam a apresentação clínica incluem: estado nutricional do hospedeiro, presença de comorbidades, quantidade e virulência de parasitos inoculados e local da inoculação (FARAH; KLAUS; FRANKENBURG; 1993). Neste contexto, a LTA pode cursar com comprometimento cutâneo, mucoso e/ou linfonodal.

Marzochi & Marzochi (1994) propuseram uma classificação clínica das leishmanioses baseada nos aspectos clínicos e evolutivos (Figura 3).

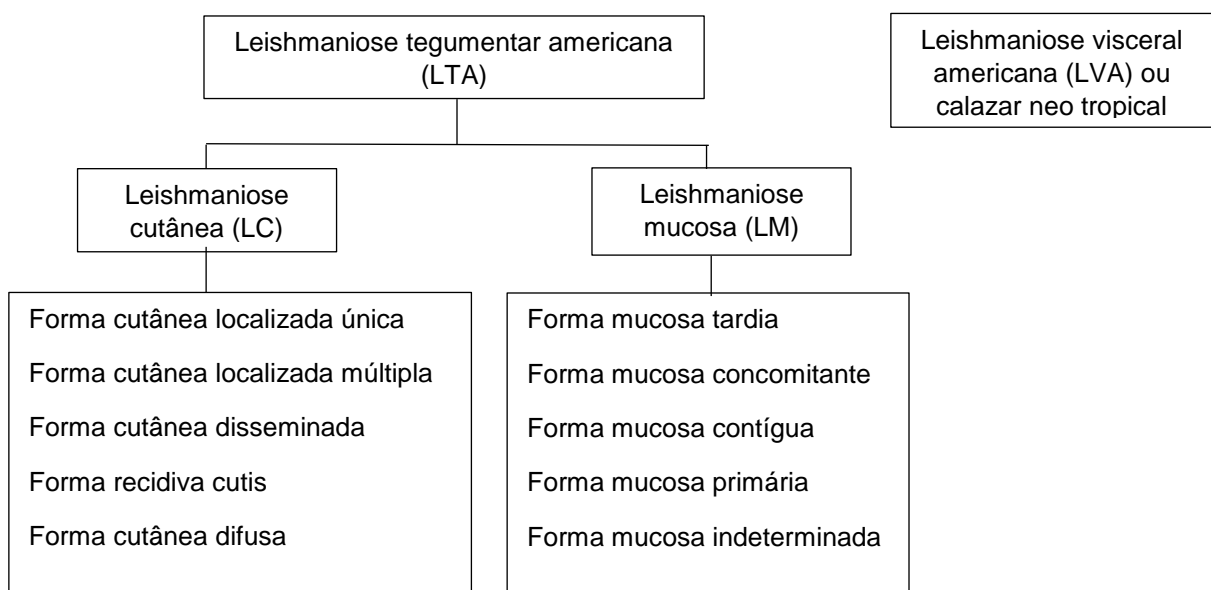


Figura 3 – Classificação clínica das leishmanioses no Brasil segundo Marzochi & Marzochi (1994)

1.3.1 Leishmaniose Cutânea (LC)

- Forma cutânea localizada única (LCL) (Figura 4): forma mais frequente, se caracteriza por lesão única que se desenvolve no local de inoculação do parasito

pelo inseto vetor. Geralmente se manifesta como úlcera indolor, de bordas infiltradas e centro eritematoso, granuloso, frequentemente acompanhada de linfadenite satélite. Caso não tratadas, tendem à cura espontânea em 6% dos casos (COTA; SOUSA; FERRETTI, 2016), entretanto alguns casos evoluem com lesões mucosas concomitantes ou de surgimento posterior (PESSÔA & BARRETO, 1948; BRASIL, 2017). Costuma apresentar intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva. Habitualmente apresentam boa resposta ao tratamento (BRASIL, 2017).



Figura 4 - Lesão típica de leishmaniose cutânea localizada: úlcera oval de bordas regulares, elevadas e fundo granuloso.

Fonte: LapClinVigiLeish – foto cedida pelo Dr. Marcelo Rosandiski Lyra

- Forma cutânea localizada múltipla: semelhante à forma anterior, é sugerido estar relacionada com múltiplas picadas do vetor e as lesões não costumam ser numerosas (< 10 lesões).
- Forma cutânea disseminada (LDi): é uma forma rara de LTA, correspondendo a 2% dos casos (BRASIL, 2017). O quadro clínico inicia-se de forma clássica com uma ou poucas úlceras seguida do surgimento de múltiplas pápulas e nódulos chegando a um número elevado (igual ou superior a 10) de lesões cutâneas polimórficas, afetando partes não contíguas do corpo.
- Forma recidiva cutis: esta forma ocorre após cicatrização espontânea ou medicamentosa da úlcera, com reativação localizada geralmente na borda da lesão.

A resposta à terapêutica é pobre ou ausente e geralmente a IDRM apresenta-se positiva.

- Forma cutânea difusa (LCD): é uma forma grave, rara, caracterizada por múltiplos nódulos, placas, tubérculos, pápulas e infiltração cutânea difusa, atingindo grandes extensões corporais. Os pacientes com essa forma apresentam anergia imunológica específica caracterizada por ausência de resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* spp. A resposta à terapêutica é pobre e a IDRM apresenta-se negativa. No Brasil é mais frequente na região Norte, sendo causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

1.3.2 Leishmaniose Mucosa

A leishmaniose mucosa (LM) é caracterizada por lesões destrutivas, de evolução arrastada, em geral nas mucosas do nariz, boca, faringe e/ou laringe (MOREIRA 1994). A LM pode ocorrer vários anos após a cicatrização da lesão cutânea primária (forma mucosa tardia) (LAINSON, 1983), embora possa ocorrer de forma isolada (formas primária ou indeterminada) ou concomitante às lesões cutâneas adjacentes ou à distância (formas contígua ou concomitante, respectivamente) (SILVEIRA *et al.* 2009). Parece ser consequente à disseminação por via hemática (LLANOS-CUENTAS *et al.*, 1985). Estima-se que 3 a 5% dos casos de LC desenvolvam lesão mucosa (BRASIL, 2017).

1.4 LEISHMANIOSE CUTÂNEA DISSEMINADA

A leishmaniose cutânea disseminada (LDi) foi primeiramente descrita clinicamente por Costa *et al.* (1986) e imunologicamente descrita por Turetz *et al.* (2002). Caracteriza-se por um número elevado (≥ 10) de lesões cutâneas polimórficas (acneiformes, nodulares, ulceradas, papulosas, pustulosas) (Figura 5 e 6), atingindo partes distintas, não contíguas do corpo (figura 5A), podendo ou não ser acompanhada de acometimento de mucosas em percentual variável de casos (TURETZ *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2011). A disseminação dos parasitos por via hemática parece ser responsável pelas numerosas lesões cutâneas e pelo

acometimento de mucosas. Seu mecanismo não é conhecido, mas o rápido surgimento de múltiplas lesões, a ausência de linfadenopatia, assim como a presença de febre em alguns pacientes, reforçam a hipótese de disseminação hemática (CARVALHO *et al.*, 1994; VIEIRA *et al.*, 2002; TURETZ *et al.*, 2002). É pouco frequente no contexto da LTA (VIEIRA-GONÇALVES, 2008), porém alguns autores têm observado um incremento em sua ocorrência (TURETZ *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2011; VERNAL *et al.*, 2015). Pode ser causada por espécies distintas de *Leishmania* – *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (GALVÃO *et al.*, 1993; CARVALHO *et al.*, 1994; COUPPIÉ *et al.*, 2004; CALVOPINA *et al.*, 2005). Propõe-se que variações antigênicas entre as espécies de *Leishmania* poderiam influenciar o desenvolvimento de disseminação após a infecção (TURETZ *et al.*, 2002) e que genótipos diferentes de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, distribuídos em áreas geográficas diferentes, seriam capazes de levar à expressão de formas clínicas distintas de leishmaniose (SCHRIEFER *et al.*, 2009; QUEIROZ *et al.*, 2012). Também já foi relatado que a LDi apresenta maior percentual de lesão mucosa, quando comparada à LCL (respectivamente 28% e 1,3%) (VIEIRA *et al.*, 2002). Ocorre com mais frequência em homens com mais de 20 anos e que trabalham no meio rural. Em pacientes com AIDS esta forma foi encontrada em até 60% dos casos (LINDOSO *et al.*, 2009). Já em relatos anteriores feitos por Carvalho *et al.* (1994) a sorologia para HIV foi negativa em todos pacientes com LDi avaliados.

Apesar do grande número de lesões, na LDi a maioria dos pacientes responde bem ao tratamento e geralmente de forma mais rápida que a LCL (VIEIRA *et al.*, 2002). Mesmo os casos com resposta proliferativa primária de linfócitos (RPL) baixa ou negativa respondem ao tratamento e reverterem a RPL para positivo (CARVALHO *et al.*, 1994). No entanto, ao compararem resposta terapêutica entre pacientes com LCL e LDi, Turetz *et al.* (2002) demonstraram que menos de 40% dos pacientes com LDi avaliados tiveram suas lesões curadas com apenas um ciclo do tratamento. Os quadros com falha terapêutica normalmente têm envolvimento de mucosa (CARVALHO *et al.*, 1994). Neste contexto, em série descrita por Machado *et al.* (2011) houve falha terapêutica em 76% dos casos.

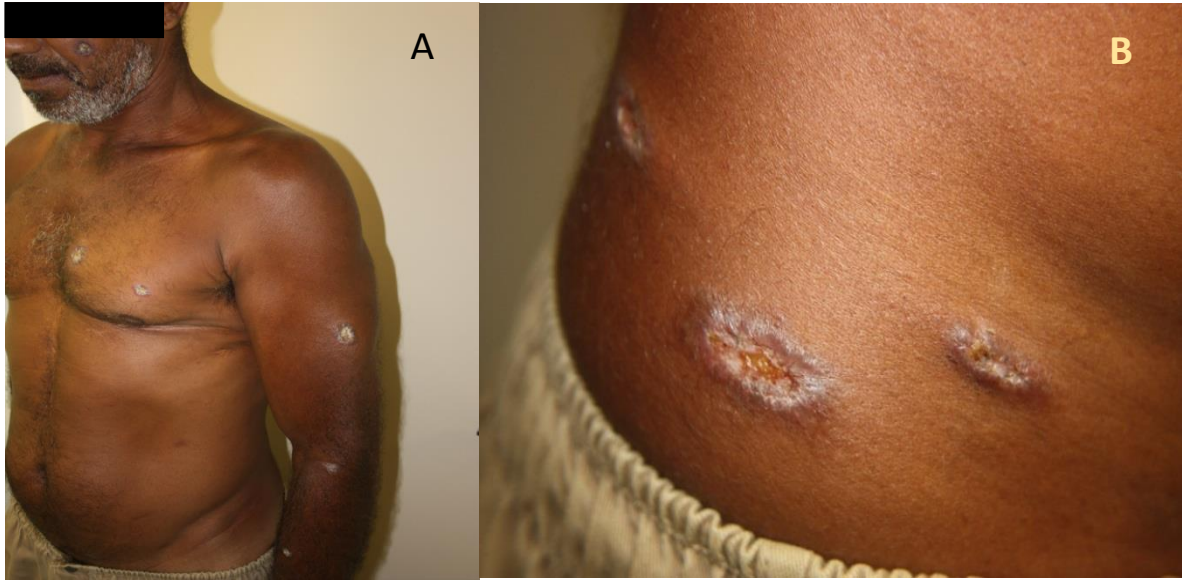


Figura 5 – Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar americana. Leishmaniose cutânea disseminada (LDi) – A e B - lesões polimórficas tipo placas infiltradas ulceradas distribuídas em todo corpo.

Fonte: LapClinVigileish- foto cedida gentilmente pelo Dr Marcelo R. Lyra

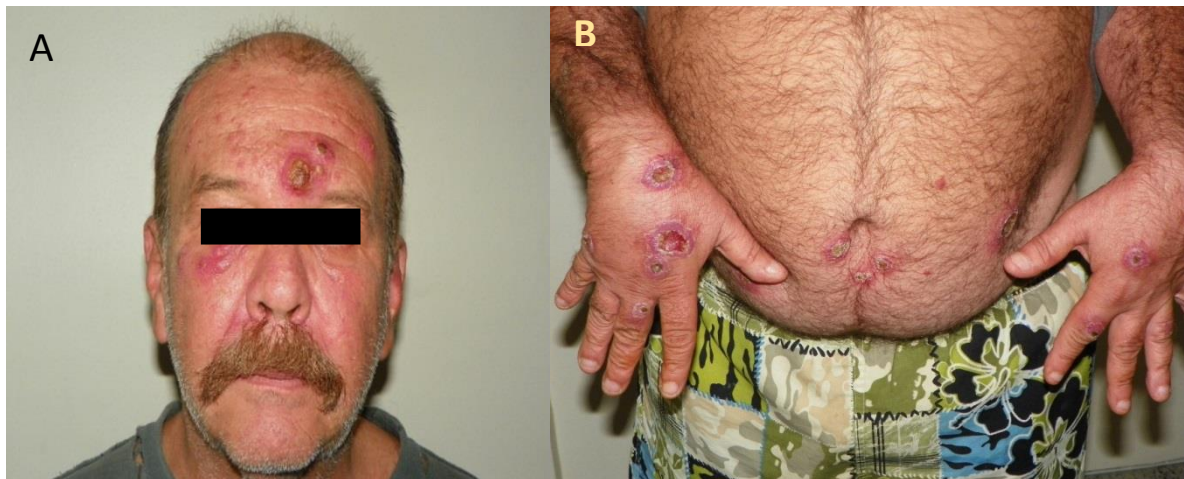


Figura 6 – Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar americana. Leishmaniose cutânea disseminada (LDi): lesões tipo placa eritematosa, infiltradas, ulceradas acometendo face (A), mãos e abdome (B).

Fonte: LapClinVigileish

1.5 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA LTA

Os protozoários que causam as leishmanioses são parasitos intracelulares obrigatórios que se multiplicam dentro das células do sistema fagocítico mononuclear nos hospedeiros vertebrados. Os resultados até agora publicados apontam para que diferentes espécies de *Leishmania*, bem como a resposta imunológica do indivíduo, determinem a forma clínica e influenciem na resposta ao tratamento (revisto por CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 2014; AZEREDO-COUTINHO e MENDONÇA, 2014).

Na infecção pela *Leishmania* spp, após a inoculação na pele, as formas promastigotas desencadeiam um processo inflamatório local inespecífico, constituído inicialmente por células *natural killer* (NK), polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos), macrófagos e pela ativação do sistema complemento. A adesão da *Leishmania* spp à superfície do macrófago é essencial para sua fagocitose. Diferentes moléculas presentes na superfície da *Leishmania* spp, como a glicoproteína 63 (gp63) e o lipofosfoglicano (LPG) interagem com receptores nos macrófagos levando a internalização do parasito, e a partir daí ocorre uma série de reações bioquímicas que podem levar à ativação ou inibição da célula hospedeira (AZEREDO-COUTINHO e MENDONÇA, 2014).

O principal mecanismo de defesa imunológica do hospedeiro contra a infecção por *L. (V.) braziliensis* depende da imunidade celular mediada pelos Linfócitos T CD4⁺. Para dar início à resposta imune celular específica, as células de Langerhans/dendríticas, presentes na epiderme, processam e apresentam antígenos parasitários aos linfócitos T CD4⁺ localizados nos linfonodos regionais. Estas tem importância na qualidade da resposta imune celular específica na Leishmaniose, pois regulam a atividade leishmanicida no interior dos macrófagos. Os linfócitos T CD4⁺ são classificados em subpopulações, de acordo com o perfil de citocinas secretado. Os linfócitos TCD4⁺ mais bem caracterizados são: T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2). Já está bem estabelecido, em modelo murino, que a evolução da infecção pela *Leishmania major* é dependente do subgrupo de células Th predominante (REED & SCOTT, 1993). As evidências demonstram que um infiltrado inflamatório com predomínio de IFN- γ (interferon-gama), produzido principalmente por células Th1, se correlaciona com resistência à infecção (ROGERS *et al.*, 2002;

revisto por CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 2014; GOMES-SILVA *et al.*, 2014). Ao contrário, a prevalência de células Th2 se correlaciona à susceptibilidade e incapacidade de controle parasitário (REED & SCOTT, 1993;).

O padrão de resposta eficaz é a que ocorre nos indivíduos com a forma LCL ou naqueles que não desenvolvem a doença. A resposta imune nesses indivíduos é caracterizada por uma produção de citocinas pró-inflamatórias, com predomínio de citocinas Th1, como IFN- γ , interleucina (IL)- 2 e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) (MENDONÇA *et al.*, 1986; SILVEIRA *et al.* 2009; CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012). No entanto, a resposta reguladora de citocinas do tipo 2 também está presente na forma LCL, pela produção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e fator transformador de crescimento-beta (TGF β). No entanto, uma resposta Th1 exagerada pode levar a dano tecidual e tem sido associada à imunopatogênese da LM (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; BACELLAR *et al.*, 2002). Assim, a resposta do tipo 1 equilibrada, com produção de citocinas tais como IFN- γ , IL-12 e TNF- α são indispensáveis para o controle da infecção por *Leishmania* spp nos macrófagos (GREEN *et al.*, 1990), as principais células hospedeiras para este parasito nos mamíferos (NADERER & MCCONVILLE, 2011).

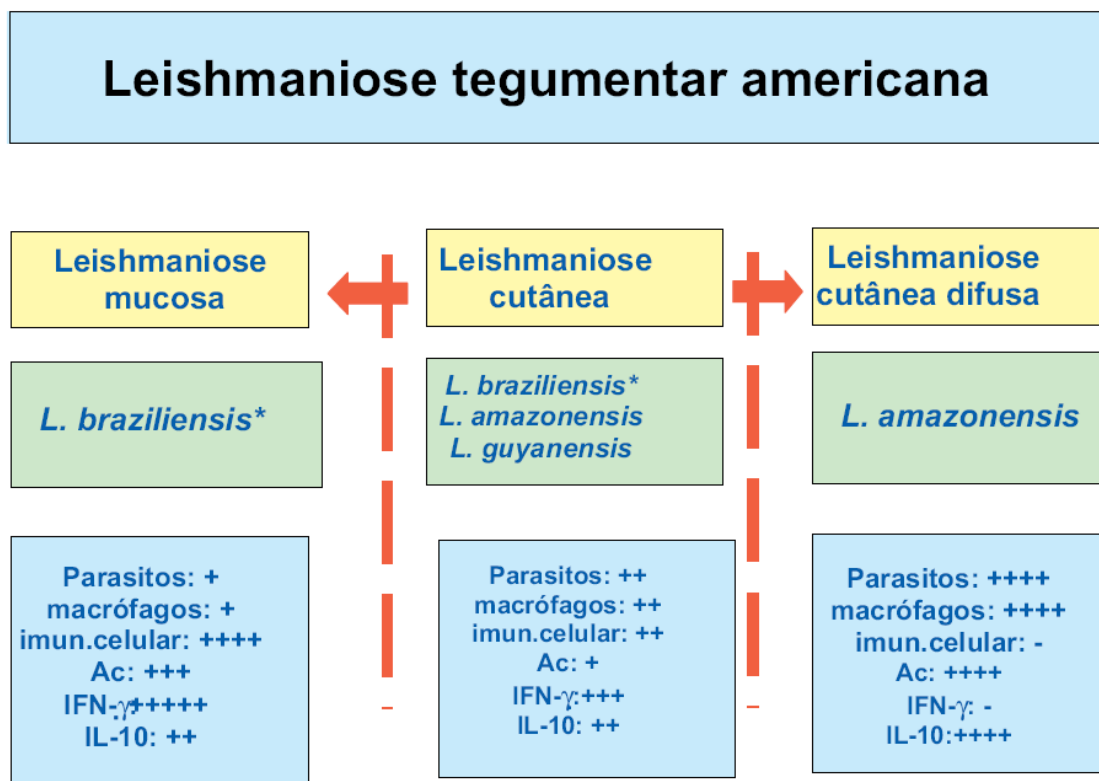
Alguns efeitos de citocinas são fundamentais para a evolução das lesões de LTA. IFN- γ leva a estimulação dos macrófagos através da expressão da enzima NOS2 (óxido nítrico sintase do tipo 2) e a consequente produção de NO (óxido nítrico) e radicais superóxidos que são os principais mediadores da morte do parasito. Kima e Soong (2013) demonstraram claramente que a infecção por espécies do subgênero *Viannia* leva a uma ativação significativa de macrófagos nos casos de LCL. Em adição, na forma LCL, quando comparadas as concentrações de macrófagos ativados e não ativados, verificou-se uma densidade 1,5 vezes maior de macrófagos ativados (CASTRO GOMES *et al.*, 2017)

Por outro lado, uma resposta imune com predomínio de citocinas Tipo 2 tais como IL-4, IL-5 e IL-10 diminuem a expressão da enzima NOS2 resultando na deficiência de estimulação dos macrófagos ao seu estágio parasiticida com consequente proliferação parasitária e uma doença grave de difícil tratamento, como no caso da forma cutânea difusa (MASPI *et al.*, 2016).

Em adição ao paradigma Th1/Th2, outras subpopulações de células T, tais como células Th17, caracterizada pela produção de citocinas inflamatórias (IL-22, IL-

17), e células T reguladoras (T reg) aliadas a produção de citocinas reguladoras (IL-10, TGF- β) contribuem para progressão ou melhora da doença dependendo da espécie da *Leishmania* e das características genéticas do hospedeiro (MASPI *et al.*, 2016).

Apesar de ainda faltarem alguns dados, hoje já é possível uma associação entre tipo de resposta imune e evolução clínica da infecção. Em conjunto se pode inferir que um espectro de formas clínicas da LTA pode se desenvolver na dependência das características da resposta imune mediada por células e da espécie/virulência do parasito. A figura 7 demonstra os diferentes padrões de resposta imune que ocorrem nas diferentes apresentações clínicas.



Legenda: * Principal espécie causadora de leishmaniose cutânea no Brasil.

Ac: Anticorpos

IFN- γ : Interferon gama

IL-10: Interleucina 10

- ausência

+ Presença : + leve; ++ moderada; +++ intensa; ++++ muito intensa

Figura 7 – Fisiopatogenia da leishmaniose tegumentar americana no Brasil

Fonte: BRASIL, 2017

Como pode ser observado na figura 7, a resposta eficaz e equilibrada é característica da LCL, em que as lesões são caracterizadas pela intensa atividade de macrófagos ativados aos estágios parasiticidas através da predominância de células Th1 que se correlaciona com resistência a infecção e controle da carga parasitária (PIRMEZ *et al.*, 1993; MORGADO *et al.*, 2008). Já na LM ocorre uma resposta imune celular exacerbada e desequilibrada com aumento expressivo de citocinas Th1 como o IFN- γ (PALMEIRO *et al.*, 2012). É sugerido que essa resposta descontrolada possa ser responsável pelo importante dano tecidual, explicando o surgimento de lesões destrutivas, extensas, de difícil tratamento. Por outro lado, na LCD (Leishmaniose cutânea difusa) ocorre depressão da resposta imune celular específica, observada pela ausência de produção de IFN- γ e o predomínio de células Th2 resultando na estimulação ineficaz dos macrófagos e, conseqüentemente, no aumento da carga parasitária evoluindo para uma doença grave de evolução crônica que pode responder mal ao tratamento (BRASIL, 2017).

A forma cutânea disseminada (LDi) pode apresentar comportamento clínico e terapêutico variado e a resposta imune destes casos ainda não é totalmente conhecida. Assim, caracterizar a resposta inflamatória local, tipo e função das células envolvidas é importante para a compreensão das diferentes apresentações clínicas de LTA.

1.6 ASPECTOS HISTOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS LDi *versus* LCL

Alguns aspectos da resposta imune foram descritos na LDi e algumas comparações com os aspectos da LCL foram publicados.

Em relação aos aspectos histopatológicos, os achados na LDi mostram-se semelhantes aos casos de LCL com reação granulomatosa com infiltração de linfócitos e proliferação vascular (TURETZ *et al.*, 2002). Apesar da semelhança, LCL apresenta mais espongiose, granuloma e necrose lítica; enquanto casos de LDi apresentam aspectos distintos na epiderme (lesões tipo úlcera na LDi apresentam hiperqueratose, espongiose e aumento da inflamação; lesão papulosa na LDi apresenta crosta de fibrina, acantose e menor inflamação), mas são semelhantes na derme (DANTAS *et al.*, 2014). Diferente da LCL, na LDi há menor frequência de hiperplasia epidérmica e a ocorrência de reação perifolicular nas lesões acneiformes

é maior. Na LDi também foi verificada a presença de edema perivascular e papilar com vasculite, podendo também serem visualizados necrose e granuloma com ou sem células gigantes (TURETZ *et al.*, 2002; DANTAS *et al.*, 2013). Vasos e células endoteliais ativadas eram proeminentes nas lesões cutâneas, havendo correlação entre a quantidade de vasos e extensão da área de inflamação (MENDES *et al.*, 2013). Nos dois artigos publicados não foi possível estabelecer o tempo de evolução através da histopatologia/imuno-histoquímica ou prever se a lesão evoluiria para cura ou progressão (DABOUL, 2010; DANTAS *et al.*, 2014).

Há sugestão de processo inflamatório progressivo e contínuo (TURETZ *et al.*, 2002), porém sem diferença de celularidade entre LCL e LDi, com predomínio de células T, entre as quais T CD8⁺ eram as mais presentes (69% das células T) seguidos de macrófagos e células B, sendo que suas concentrações poderiam variar de acordo com a intensidade da inflamação (VIEIRA *et al.*, 2002; DANTAS *et al.*, 2014; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Apesar de a maioria dos estudos demonstrar predomínio de células CD8⁺ nas lesões, semelhança na relação CD4-CD8 já foi descrita (VIEIRA *et al.*, 2002). Em um único artigo publicado foi realizada a associação entre progressão da lesão e a presença de células CD8⁺ com expressão de granzima B, o que poderia auxiliar no controle da carga parasitária, mas ao mesmo tempo facilitaria a injúria da membrana basal, levando a ulceração (DANTAS *et al.*, 2013). Há controvérsias em relação ao papel de células T CD8⁺ na LTA: alguns estudos demonstram aumento da frequência dessas células em pacientes curados de LTA sugerindo uma participação benéfica na resposta imune contra a *Leishmania* spp (DA-CRUZ *et al.*, 1994; CUNHA *et al.*, 2016). No entanto, outros estudos mostram que essas células também participam da doença ativa e estão envolvidas com dano tecidual (CASTRO GOMES *et al.*, 2017).

As lesões de LDi têm tendência a apresentar altas taxas de anticorpos, mesmo os casos com resposta linfoproliferativa baixa ou negativa (CARVALHO *et al.*, 1994). A produção de anticorpos parece estar relacionada às formas mais graves da infecção; no entanto, em modelo murino de leishmaniose cutânea, a depleção de células B não alterou a suscetibilidade e resistência (VIEIRA *et al.*, 2002).

Dantas *et al.* (2014) não detectaram grandes concentrações de neutrófilos nas lesões de LDi, mas este dado precisa de confirmação pois Daboul (2010)

discute que neutrófilos seriam presentes em fases iniciais e que, mesmo em fases tardias poderiam responder a processo de reagudização.

Estudos *in vitro* da resposta imune no sangue periférico de pacientes apresentando LDi sugerem a ocorrência de uma mistura de respostas tipo 1 e tipo 2, no entanto, algumas avaliações apresentaram diferenças em seus achados. Alguns autores sugeriram que pacientes com LDi poderiam apresentar diminuição de IFN- γ e TNF- α e tendência a aumento de IL-10 e IL-5 quando comparados aos pacientes com LCL (CARVALHO *et al.*, 1994; TURETZ *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2015). Estudos *in situ* indicam que TNF- α e NOS2 mostram-se semelhante entre LCL e LDi (VIEIRA *et al.*, 2002). A se considerar estes relatos, a expressão semelhante de NOS2 em lesões com menos quantidade de IFN- γ sugere que NOS2 esteja sendo estimulada por outras vias (MENDES *et al.*, 2013).

Foi ainda sugerido o aumento da atividade inflamatória vascular pela detecção de células CD31⁺ e o fator de Von Willebrand (vW), demonstrando que a vascularização pode ter um papel importante na evolução clínica das lesões de LDi (MENDES *et al.*, 2013).

Em conjunto, a análise dos dados, mesmo com os resultados recentemente publicados, indica que ainda não é possível entender os mecanismos que determinam o surgimento de lesões disseminadas em pacientes com LTA. Neste contexto, a avaliação de maior número de pacientes e de marcadores de função de resposta imune, principalmente aqueles ligados ao processo de regulação do processo inflamatório, poderá trazer esclarecimentos sobre a imunopatogenia da LDi.

A LDi tem sido descrita na literatura em pacientes imunocompetentes, com resposta positiva à IDRМ e sem sinais de imunocomprometimento. No entanto, foram relatados casos de LDi em indivíduos HIV positivos com imunodeficiência avançada (SCHRANER, 2005; LINDOSO *et al.*, 2009) ou nos quais a doença pode surgir como manifestação de uma síndrome inflamatória de reconstituição imunológica (CHRUSCIAK-TALHARI, 2009), bem como em pacientes com outras condições também causadoras de imunossupressão como uso crônico de corticoides, diabetes, hipotireoidismo, síndrome de Down, linfedema (MOTTA *et al.*, 2003; AGHAEI, 2004; SADEGHIAN *et al.*, 2005). No entanto, é preciso identificar se

estas duas formas de apresentação de lesões disseminadas na LTA podem ser consideradas semelhantes, já que o grau de comprometimento do sistema imune pode ser diferente.

1.7 DIAGNÓSTICO

A história epidemiológica e avaliação clínica podem ser insuficientes para a confirmação diagnóstica de LTA, sendo muitas vezes necessários outros exames complementares (BRASIL, 2017).

O diagnóstico laboratorial baseia-se em: exames parasitológicos (pesquisa de amastigota em esfregaço de lesão ou *imprint* de fragmento de tecido, cultura em meios artificiais, inoculação em animais experimentais), exame histopatológico (hematoxilina e eosina, imuno-histoquímica), exames imunológicos (IDRM, Sorologia), exames moleculares (PCR – reação em cadeia da polimerase) (BRASIL, 2017). A pesquisa de amastigotas pela histopatologia/imuno-histoquímica e a PCR podem também ser considerados exames parasitológicos.

Os métodos parasitológicos, que podem ser diretos ou indiretos, são considerados de certeza porque se baseiam no encontro do parasito, ou de seus produtos. Nos métodos diretos, a pesquisa das formas amastigotas pode ser realizada através da escarificação, biópsia com impressão por aposição (*imprint*) ou punção aspirativa das lesões. A chance de encontrar o parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução. De Mello *et al.* (2011), em estudo comparando a sensibilidade de testes parasitológicos diretos das lesões de LTA, encontraram valores de 70% de positividade para *imprint*, 42,5% para escarificação da borda externa da lesão e de 62,5% para escarificação da borda interna. Quando os três exames foram associados, resultaram em uma sensibilidade de 77,5%. Os exames parasitológicos indiretos visam o isolamento do parasito a partir de fragmento de lesão ou material retirado por punção aspirativa ou escarificação, semeado em meios de cultura apropriados, como o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle - NNN que permite a visualização de formas promastigotas com boa sensibilidade (FURTADO, 1980; ROMERO *et al.*, 2001).

Os índices de sensibilidade dos exames histopatológicos apresentam ampla variação (FURTADO, 1980; AMATO *et al.*, 2003), entretanto a imuno-histoquímica demonstra maior sensibilidade que a coloração por hematoxilina-eosina para a detecção do parasito (QUINTELLA *et al.*, 2009).

Além da visualização direta/indireta do parasito, exames imunológicos/moleculares como a IDRM, as reações sorológicas como ELISA, Imunofluorescência e Teste da Aglutinação e os exames moleculares como a PCR (reação em cadeia da polimerase) podem ser usados como coadjuvantes no diagnóstico de LTA.

A IDRM constitui-se num marcador para avaliação da resposta celular de hipersensibilidade tardia a antígeno de *Leishmania* spp inoculado por via intradérmica e não é capaz de distinguir lesão ativa de infecção passada. Após 48h-72h da injeção deve-se medir a área de induração da lesão formada, sendo o exame positivo quando o diâmetro desta área for maior ou igual a 5 mm. A positividade da IDRM independe da duração das lesões, do gênero ou da idade dos pacientes (MANZUR& BARI, 2006), sendo de alta sensibilidade, com positividade próxima a 100% (FURTADO, 1980; MENDONÇA *et al.*, 1986; ANTÔNIO *et al.*, 2014). Pode ser negativa nas primeiras quatro a seis semanas a partir do início da lesão cutânea (BRASIL, 2017). Pacientes com LM costumam apresentar IDRM exacerbada podendo ocorrer ulceração e necrose local, enquanto na forma cutânea difusa, na forma visceral clínica e em indivíduos imunodeprimidos costuma ser negativa (BRASIL, 2017).

Os testes sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro. Nos pacientes com LC, constata-se níveis geralmente baixos ou moderados de anticorpos específicos detectados por reação de imunofluorescência indireta – RIFI, ou reação imunoenzimática - ELISA, em comparação com os níveis encontrados nos pacientes com LM, LCD e LV; entretanto, existem variações individuais (GUIMARÃES *et al.*, 1983).

1.8 TRATAMENTO

Os antimoniais pentavalentes constituem os fármacos de primeira linha para o tratamento da LTA em qualquer apresentação clínica (World Health Organization, 2010), e no Brasil a formulação disponível é o antimoniato de meglumina (AM), sendo recomendada dose de 10 a 20mg Sb⁵⁺/kg/dia durante 20 dias (BRASIL, 2017). Caso não ocorra cicatrização completa da lesão após 3 meses do término do tratamento recomenda-se um novo ciclo de AM. No caso de um novo insucesso, será considerada falha terapêutica e deverá ser introduzido um medicamento de segunda escolha, anfotericina B ou Pentamidina (BRASIL, 2017). O sucesso dos antimoniais varia largamente (ROMERO *et al.*, 2001). Vários fatores foram associados com falha terapêutica: mais de três lesões, tratamento prévio para LTA, alto peso corporal e esquema de tratamento incompleto (RODRIGUES *et al.*, 2006) ou com subdoses (SOTO&SOTO, 2006), tratamento iniciado em lesões com menos de dois meses de evolução, e pacientes com resposta imune celular reduzida (demonstrada pela baixa intensidade da reação da IDRM) (ANTONIO *et al.*, 2014). No entanto, estudos clínicos realizados no Rio de Janeiro sugerem que o uso de esquemas regulares com baixa dose de AM (5mg Sb⁵⁺/kg/dia por 30 dias) por via sistêmica (SCHUBACH *et al.*, 2005), tanto quanto por via intralesional do AM em doses dependentes da área da lesão (VASCONCELLOS *et al.*, 2010) podem ser mais fáceis de administrar, permitindo tratamento mais eficaz com menor toxicidade e custo, alcançando percentuais de cura semelhantes àqueles obtidos com doses mais elevadas (OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1997).

A anfotericina B é considerada de primeira escolha para o tratamento de gestantes com LTA. Pacientes que *a priori* não possam utilizar o antimonial podem ser tratados com anfotericina B ou pentamidina, sendo estes medicamentos de segunda escolha também para aqueles que não obtiveram resposta satisfatória ou desenvolveram eventos adversos graves após o uso do antimonial (BRASIL, 2017). Outras drogas como metildopa e alopurinol têm sido empregadas sem dados conclusivos (SCHUBACH *et al.*, 2014).

A LDi pode responder bem ao tratamento convencional com antimoniais pentavalentes (CARVALHO *et al.*, 1994), porém existem casos descritos de resistência medicamentosa nesta condição (TURETZ *et al.*, 2002), inclusive má

resposta ao tratamento com anfotericina B (SCHRANER, 2005). Má resposta terapêutica foi observada em pacientes com LDi causada por *L. amazonensis*, mas não com *L. braziliensis* (CARVALHO *et al.*, 1994). Em resumo, os relatos publicados demonstram que este é um assunto ainda controverso, pois não há estudos suficientes para corroborar uma conclusão sobre resposta terapêutica da LDi.

Recentemente o Ministério da saúde recomendou uma série de novas diretrizes com relação ao tratamento da LDi. Segundo o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar de 2017 a LDi deve ser tratada apenas em centros de referência e na dose de 20mg Sb⁵⁺/kg/dia por 30 dias. Nos pacientes com mais de 50 anos de idade, gestantes ou portador de certas comorbidades (HIV, insuficiência renal, hepática ou cardíaca) se recomenda o uso da Anfotericina B lipossomal na dose de 2 a 3mg/kg/dia até atingir a dose total de 35 a 40 mg/Kg (BRASIL, 2017). Ressalta-se que, anteriormente, aos pacientes com LDi era recomendado o mesmo tratamento que para os pacientes com leishmaniose cutânea localizada única ou múltipla (BRASIL, 2010).

Tem sido verificado que as manifestações clínicas da LTA e a resposta ao tratamento podem estar ligados ao estado imune do paciente e parcialmente relacionados à espécie de *Leishmania* envolvida (LAINSON & SHAW, 1987). Diferentes leishmanias comportam-se de modo diverso frente ao tratamento com antimoniais pentavalentes, podendo algumas populações de *Leishmania* desenvolver resistência a esta medicação, provavelmente por seleção natural de clones (CROFT *et al.*, 2006; AZEREDO-COUTINHO *et al.*, 2007). Neste sentido, Saravia e colaboradores (1990) observaram associação entre espécies do subgênero *Viannia*, especialmente *L. (V.) braziliensis*, com recaídas.

Parasitos foram isolados de cicatrizes após a cura clínica e a presença de DNA de *Leishmania* spp foi detectada em amostras de sangue e cicatrizes de pacientes curados (SCHUBACH *et al.*, 1998; MORGADO *et al.*, 2010). Os indivíduos portadores de parasitos persistentes podem permanecer assintomáticos ou evoluir com recaídas e recorrências da doença (SARAVIA *et al.*, 1990). Por outro lado, o fato de haver persistência parasitária, possibilita que o sistema imune seja constantemente estimulado, mantendo um pool de células efetoras específicas aos antígenos de *Leishmania* spp sendo capazes de induzir uma ação protetora (GOMES-SILVA *et al.*, 2014). Os mecanismos que levam à lesão mucosa

permanecem por serem elucidados, mas a persistência de parasitos viáveis em cicatrizes é importante para o entendimento do posterior desenvolvimento de LM. Além disto, o *status* imunológico do hospedeiro afeta a eficácia da medicação, sendo falhas mais comuns em pacientes HIV - positivos (AMATO *et al.*, 2004).

O fenômeno de falha terapêutica tem aumentado em número nos últimos anos (RODRIGUES *et al.*, 2006) e novas drogas tem sido testadas tanto *in vitro* quanto em modelos experimentais, mas nenhuma das drogas testadas até o momento demonstrou maior eficácia e/ou menos efeito adverso que as atualmente em uso.

1.9 ESTUDOS *IN SITU* NA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA LTA

Nos últimos anos, a compartimentalização da resposta imune tem sido considerada um fato e na LTA vários autores tem se debruçado na avaliação do infiltrado inflamatório no sítio das lesões (revisto por CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 2010). Uma das formas mais diretas de avaliar o tipo, a organização e a intensidade da resposta inflamatória em lesões teciduais é o estudo da expressão de marcadores celulares e funcionais *in situ*. Neste contexto, várias abordagens são possíveis: microscopia confocal, microscopia eletrônica, imuno-histoquímica, PCR e hibridização *in situ*. Todas se baseiam na utilização de anticorpos monoclonais e/ou policlonais e/ou sondas moleculares e na revelação da presença desses marcadores pela utilização de complexos enzimáticos (exemplo – imuno-histoquímica), marcadores fluorescentes (microscopia confocal), compostos metálicos (microscopia eletrônica) ou sondas radioativas (hibridização *in situ*), entre outros. Dentre as várias possibilidades, a imuno-histoquímica tem sido amplamente usada na avaliação do perfil inflamatório de tecidos. Dependendo dos marcadores celulares e/ou funcionais, podem-se traçar perfis de atividade inflamatória.

O arsenal de anticorpos primários dirigidos aos diversos componentes da resposta imune tem aumentado nos últimos anos, permitindo uma avaliação mais acurada das alterações teciduais provocadas pela inflamação. Alguns destes marcadores são clássicos e amplamente avaliados, mas outros têm surgido,

principalmente aqueles que detectam atividade e funcionalidade, permitindo uma avaliação mais detalhada do processo inflamatório *in situ* e assim possibilitando uma melhor correlação entre a resposta inflamatória e a evolução das lesões. Alguns marcadores são:

1.9.1 Linfócitos e suas subpopulações

Os linfócitos T são as principais células da resposta imune adaptativa. Eles se dividem classicamente em linfócitos T auxiliares ou *helper*, linfócitos T citotóxicos e linfócitos T reguladores, mas outras subpopulações têm sido descritas como Th3 e Th17 (ABBAS & LICHTMAN, 2015). Todos eles possuem receptores TCR (receptor de células T) e CD3 e as moléculas correceptoras, CD4 e CD8 que são glicoproteínas transmembranares. A molécula CD4 se liga ao MCH-II e está presente nos linfócitos T auxiliares e reguladores, assim como em células apresentadoras de antígenos; e CD8 se liga ao MHC-I e está presente nos linfócitos T citotóxicos.

A molécula CD22 é um marcador para linfócitos B, pois é uma proteína associada ao receptor de antígeno da célula B (BCR) e participa da regulação deste tipo celular, via sinalização transmembranar, em resposta a antígenos estranhos (ABBAS & LICHTMAN, 2015).

1.9.2 CD 68 (Macrófagos), NOS2 (óxido nítrico sintase do tipo 2)

CD68 é uma glicoproteína transmembranar presente principalmente nos lisossomos dos macrófagos e apresenta função ainda desconhecida (ABBAS & LICHTMAN, 2015).

A NOS2 é uma enzima celular que catalisa a síntese de NO (óxido nítrico) a partir do aminoácido L-arginina, que atua nos mecanismos de citotoxicidade dos macrófagos contra organismos intracelulares (Figura 8). Estudos mostram que, a expressão da NOS2 e a geração de NO em resposta a IFN- γ e ao TNF- α são importantes no controle da infecção em diferentes espécies de *Leishmania* (MORGADO *et al.*, 2008). Citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4) diminuem sua expressão e conseqüentemente a produção de NO, inibindo a eliminação de

parasitos intracelulares em macrófagos humanos infectados, gerando formas graves de leishmaniose (CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 2014).

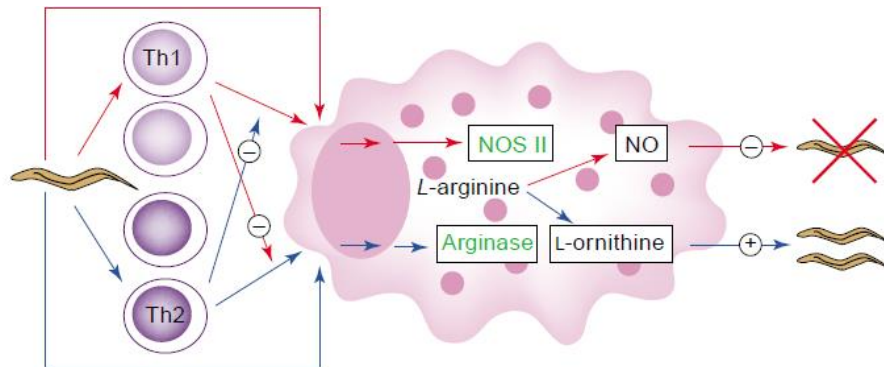


Figura 8 – Ação das enzimas óxido nítrico sintase (NOSII) e arginase em macrófagos como modulador de seu efeito em tripanossomatídeos

Fonte: VINCENDEAU *et al.*, 2003

1.9.3 Elastase Neutrófila (Neutrófilos e precursores de neutrófilos)

Os neutrófilos são células polimorfonucleares efetoras do sistema imune inato, que são produzidas na medula óssea e que, pela interação com monócitos, células dendríticas, células T e células B, através do contato célula a célula ou por produtos secretados, influenciam a resposta inflamatória envolvendo a defesa do hospedeiro, a fagocitose de microorganismos e a reparação de tecidos durante uma infecção (NATHAN, 2006; NOVAIS *et al.*, 2009). Podem ser detectados através de marcadores enzimáticos como a elastase neutrófila que é uma serina proteinase presente nos grânulos primários de leucócitos polimorfonucleares os quais são liberados após sua ativação (ABBAS & LICHTMAN, 2015).

NETs (“Neutrophil extracellular traps”, redes/armadilhas extracelulares neutrófilicas) são estruturas extracelulares compostas principalmente por cromatina, histona e proteínas específicas dos grânulos de neutrófilos. As NETs são formadas após ativação, seguida pela morte de neutrófilos por IL-8, lipopolissacarídeos (LPS), bactérias, fungos ou ativação de plaquetas (BRINKMANN & ZYCHLINSKY, 2007). NETs são dotadas de propriedades para prender e matar microorganismos distintos tais como *Mycobacterium tuberculosis*, fungos, HIV-1, protozoários, bem como diferentes espécies de *Leishmania* (BRINKMANN & ZYCHLINSKY, 2007; GUIMARÃES - COSTA *et al.*, 2009).

Em recente estudo *in situ* em lesões de LTA, Morgado *et. al* (2015) descreveram correlação positiva entre o tamanho da NET e a quantidade de amastigotas intactas, sugerindo que a migração de neutrófilos e a formação de NET poderiam ser estimuladas e mantidas por estímulos derivados do antígeno e da carga parasitária. Além disso, os autores observaram que as NETs estavam em estreita proximidade com neutrófilos e amastigotas.

1.9.4 Triptase de Mastócitos

Mastócitos são descritos como principais células efetoras da reação alérgica, mas também desempenham papel na resposta inata e adquirida. Possuem várias enzimas em grânulos citoplasmáticos e a triptase é considerada marcador destas células. Além disso, Oliveira *et al.* (2005) publicaram resultados sugerindo capacidade das formas promastigotas da *L. braziliensis* induzirem diretamente a ativação dessas células favorecendo assim o estabelecimento inicial da infecção.

Amato *et al.* (2008) evidenciaram redução do número de mastócitos após tratamento tanto das formas cutâneas quanto das formas mucosas da leishmaniose, associada com a diminuição de IL-4 e IFN- γ .

1.9.5 CD56 (Células natural killer - NK)

São células com capacidade citotóxica, que apresentam alguns marcadores de superfície, entre eles a molécula CD56. Esta molécula também pode ser expressa em NKT *cells*, mas sua presença associada ao aspecto morfológico permite identificar células NK. A principal via usada pelos linfócitos T citotóxicos e células NK, a fim de eliminar células patogênicas, é a exocitose de componentes granulares em direção às células-alvo, proporcionando sua destruição. Destacam-se a granzima B e a perforina. A importância das células NK no controle da infecção deve-se tanto à sua ação citotóxica quanto ao fato de ser fonte primária de IFN- γ . Células NK são ativadas no início da infecção na LC, mas o seu papel citotóxico não é bem conhecido, podendo ser tanto benéfico quanto deletério. Poucos trabalhos

foram publicados avaliando a ação de células NK em LTA. Entre eles podemos citar Cunha *et al.* (2016) que observaram baixa frequência de células NK CD107A⁺ em todos pacientes de LTA avaliados. A expressão de CD107A pelas células NK foi baixa nos pacientes curados, e isso sugere a supressão da atividade dessas células. Além disso, alguns eventos podem contribuir para diminuição de sua atividade, tais como ação de TGF- β e IL-10 (CUNHA *et al.*, 2016).

1.9.6 Ki67

Marcador de proliferação celular. O anticorpo anti-Ki67 reconhece um antígeno no núcleo celular. Trata-se de uma proteína presente nas células em proliferação.

Morgado *et al.* (2008) demonstraram a presença significativa de células Ki67⁺ nas lesões de LTA e uma correlação positiva entre células Ki67⁺ e linfócitos T CD4⁺ mostrando atividade proliferativa nestas lesões. Em artigo posterior foi demonstrado que havia diminuição da expressão de Ki67 no processo de cura das lesões (MORGADO *et al.*, 2010).

1.9.7 CD25

A maior parte dos linfócitos T CD4⁺ expressa a molécula CD25 que é uma subunidade do receptor de IL-2, que quando presente, tanto pode estimular como suprimir a proliferação de células T efectoras (SAKAGUCHI *et al.*, 1995). Em associação com Foxp3 é considerado um marcador de células T regulatórias (Treg).

Há evidências de que células Treg CD4⁺CD25⁺ desempenham papel fundamental no processo infeccioso pela *Leishmania* spp. Essas células têm capacidade de controlar a resposta imune excessiva ou mal dirigida. Em camundongos susceptíveis células T reg CD4⁺CD25⁺ suprimem a resposta Th2 excessiva, enquanto que em camundongos resistentes controlam a resposta Th1, a sobrevivência do parasito e a manutenção de resposta de memória (BELKAID, 2003).

2 JUSTIFICATIVA

Várias questões podem ser levantadas: por que alguns pacientes apresentam a forma disseminada da LTA? Diferenças nos aspectos imunológicos *in situ* poderiam explicar o comportamento da LDi em comparação com as formas típicas de LC?

Podemos indagar se a resposta imune do hospedeiro é determinante, já que estudos recentes têm mostrado que a *L. braziliensis* circulante no Rio de Janeiro é bastante homogênea e apesar disto, casos atípicos como LDi são diagnosticados em nossa região (AZEREDO-COUTINHO *et al.*, 2007; BAPTISTA *et al.*, 2009). No entanto, esta relação de causa e efeito ainda não está completamente estabelecida. Outros fatores como comorbidades, fatores ambientais, etc., poderiam influenciar o surgimento de LDi. As lesões de LTA são caracterizadas pela reação inflamatória do tipo crônico granulomatoso, com intensa infiltração linfoplasmocitária (QUINTELLA *et al.*, 2009). Nas lesões típicas, ou seja, naquelas com presença de uma ou poucas úlceras com bordas infiltradas e fundo granuloso, já foi descrita a predominância de linfócitos T, macrófagos e neutrófilos (MORGADO *et al.*, 2008). A formação da úlcera tem sido sugerida no modelo murino de estudo como sendo decorrente do processo inflamatório, e não necessariamente pela presença do parasito (BELKAID *et al.*, 2002); ocorrendo o surgimento da lesão no momento em que o processo inflamatório começa a se instalar, e que neste mesmo ponto a carga parasitária diminui.

Com base nas informações já publicadas surgiram hipóteses para a compreensão da ocorrência de LDi em comparação com LC típica: a) A carga parasitária poderia ser maior, nestes casos levando a um estímulo diferenciado na resposta imune específica; b) A resposta imune poderia apresentar diferenças entre ambas as formas clínicas, tendendo ao desequilíbrio, com variações dos fenômenos de toxicidade celular e conseqüente destruição tecidual. No entanto, faltam dados, notadamente em relação aos fenômenos que controlam a resposta imune, que possam esclarecer a importância da modulação da resposta imune local e sistêmica na manutenção da LTA como fenômeno localizado ou a possibilidade de dispersão hemática ou linfática levando ao surgimento de lesões disseminadas à distância da lesão primária. Com a abordagem proposta espera-se identificar aspectos da

resposta imune *in situ* que possam elucidar o comportamento diferenciado da doença nos pacientes com LDi, quando comparados aos que desenvolvem formas típicas de leishmaniose cutânea.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar comparativamente características clínico-laboratoriais e imunológicas *in situ* entre pacientes com LDi e pacientes com LCL atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LapClinVigileish), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), entre 1989 e 2014.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever os aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes de LDi, comparando-os com aqueles que apresentavam forma cutânea localizada de LTA.

- Descrever os aspectos imunológicos *in situ* dos pacientes com LDi utilizando técnicas de exame histológico com coloração pela hematoxilina-eosina e imunohistoquímica com diversos marcadores de resposta imunológica tecidual.

- Comparar os aspectos imunológicos *in situ* dos pacientes com LDi, com aqueles dos pacientes com LCL.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo seccional, com pacientes atendidos no LapClinVigiLeish, INI, Fiocruz, entre janeiro de 1989 e dezembro de 2014, com LDi e LCL. Foram analisados dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos a partir de prontuários e banco de dados sob a guarda do LapClinVigiLeish – INI – Fiocruz. Para o estudo *in situ* foram avaliados fragmentos de lesões cutâneas obtidos por procedimentos de biópsia antes do tratamento. As amostras estão estocadas em biorrepositórios no Instituto Oswaldo Cruz (IOC), sob a guarda da Dra. Fátima Conceição-Silva (Laboratório de Imunoparasitologia – LIP – Instituto Oswaldo Cruz – IOC – Fiocruz).

Os estudos imunológicos *in situ* são seccionais de pacientes com LDi com controle pareado de pacientes com LCL. Foi feito inicialmente uma seleção de pacientes com LDi. Sequencialmente foi realizada a seleção do grupo controle por pareamento com pacientes com LCL lesão única diagnosticados no LapClinVigiLeish no mesmo período, com o dobro do número de pacientes com LDi. Os parâmetros para pareamento foram gênero e idade. Os dados foram utilizados para elaboração de bancos de dados, que estão sob a responsabilidade dos pesquisadores participantes.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado sob o número CAAE 49604215.1.0000.5262 como subprojeto do projeto principal “Estudo clínico, laboratorial, imunológico e molecular comparativo entre pacientes com a forma cutânea típica e forma cutânea disseminada da leishmaniose tegumentar americana atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, 1989 a 2014.” A realização de fotografias para a documentação dos casos, coletas de sangue para exames diagnósticos e imunológicos, e coleta de fragmentos de lesões cutâneas para

exames diagnósticos e imunológicos, foram realizados mediante a assinatura do TCLE do “Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INI/FIOCRUZ, sob número CAAE 0016.0.009.000-02. Nenhum material adicional foi necessário; nenhum paciente foi submetido a procedimento diferente dos utilizados durante a rotina para diagnóstico.

Foi assinado um termo de confidencialidade que foi incluído no prontuário dos pacientes estudados. Qualquer paciente poderia se recusar a deixar que seus dados ou amostras de tecidos fossem analisados como parte desse estudo, a qualquer momento, sem prejuízo do seu tratamento ou acompanhamento no LapClinVigiLeish.

Este estudo cumpre normas éticas e está de acordo com a resolução 466/2012 da CONEP. O estudo é retrospectivo. Não houve interferência do estudo com relação ao diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos pacientes, que foi feito conforme os procedimentos de rotina do LapClinVigiLeish.

4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foi utilizada amostra de conveniência incluindo os pacientes com LDi e pelo menos o dobro de pacientes com LCL investigados no LapClinVigiLeish durante o período do estudo, entre janeiro de 1989 a dezembro de 2014. Para fins desse estudo, consideramos como forma cutânea localizada (LCL) somente as formas cutâneas com lesão única. Aqueles que apresentaram mais de uma lesão cutânea (forma cutânea localizada com lesões múltiplas) não foram incluídos nesse trabalho. LDi foi identificada pela definição de caso de presença de 10 ou mais lesões cutâneas polimórficas (acneiformes, nodulares, ulceradas, papulosas, pustulosas), acometendo 2 ou mais partes distintas, não contíguas do corpo, podendo ou não estar acompanhadas de acometimento de mucosas. Um total de 17 pacientes com LDi e 34 pacientes com LCL lesão única foram incluídos no estudo que foi dividido em: Estudo 1 – estudo clínico-laboratorial (n LDi= 17; n LCL= 34), e Estudo 2 – estudo *in situ* através de técnica de imuno-histoquímica (n LDi= 16; n LCL= 32).

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos os pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) relacionado aos estudos desenvolvidos pelo LapClinVigileish neste período: “Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz” e do “Ensaio clínico fase III para Leishmaniose tegumentar americana. Equivalência entre o esquema padrão e alternativos com antimoniato de meglumina” (Anexo I)

Além da assinatura do TCLE outros critérios de inclusão foram usados de acordo com o estudo.

4.4.1 Critérios de Inclusão – Estudo 1 (clínico-laboratorial)

- Para esse estudo foram incluídos pacientes com LDi e LCL, atendidos no LapClinVigileish, que apresentaram dados clínicos e laboratoriais disponíveis.

4.4.2 Critério de Inclusão – Estudo 2 (estudo *in situ*)

- Foram incluídos pacientes com LDi e LCL, do Estudo 1, que tinham fragmentos teciduais coletados por biópsia disponíveis em bom estado de conservação.

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes que, por qualquer motivo (recusa, nível de compreensão deficitário etc), não assinaram o TCLE dos projetos acima discriminados;

- Extremos de idade (menores de 18 anos e maiores de 80 anos), devido às alterações fisiológicas da resposta imune.

- Pacientes que, por algum motivo apresentassem alteração da resposta imune (exemplo – HIV/AIDS, doenças autoimunes, uso prolongado de corticoides ou imunossuppressores, etc.)

4.6 ESTUDO CLÍNICO LABORATORIAL (ESTUDO 1):

A coleta de dados clínicos e laboratoriais foi realizada a partir do banco de dados de pacientes do LapClinVigileish e em pesquisa de prontuário quando necessário e os dados foram compilados em formulário específico desse estudo (anexo II). Foram consideradas variáveis de importância: sexo, idade, tempo de evolução, número de lesões, localização das lesões, cultura, histopatologia, *imprint*, IDRM, PCR, sorologia, tratamento e desfecho.

4.7 ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA *IN SITU* (ESTUDO 2):

Os pacientes incluídos foram submetidos, durante a fase de investigação diagnóstica, a uma biópsia de lesão cutânea (procedimento de rotina, previsto no projeto “Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz”).

Biópsia: De modo sucinto, após assepsia e anestesia local, foi retirado pelo médico responsável, um fragmento da borda da lesão. O tecido obtido foi dividido em várias partes, enviado para exames de rotina diagnóstica (culturas, *imprint*, exame histopatológico), e para análise imunológica por imuno-histoquímica.

Histopatologia das lesões: a histopatologia das lesões foi realizada de rotina durante o procedimento diagnóstico. Na medida da necessidade foi solicitado ao Serviço de Anatomia Patológica do INI – Fiocruz o detalhamento do laudo para obtenção de dados suplementares referentes às alterações arquiteturais de epiderme e derme.

Preparação dos fragmentos teciduais para estudos da resposta imune por imuno-histoquímica: fragmentos de tecidos das lesões biopsiadas no momento do diagnóstico foram imediatamente emblocados em resina OCT (Sakura, USA) e estocados a -196°C até o momento do uso. Cortes de 3 µm de espessura (criostato Leica, Alemanha) foram apostos em lâminas de microscopia (silanized slides,

DakoCytomation, Carpinteria, Clostrup, Dinamarca) e fixados em acetona PA (reagent grade, Merck, Darmstadt, Alemanha). A imuno-histoquímica foi realizada como previamente descrito (MORGADO *et al.*, 2008; MORGADO *et al.* 2010). Resumidamente, os cortes fixados foram hidratados em PBS, as ligações inespecíficas bloqueadas com soro de cabra normal (ZymedLab Inc, San Francisco, CA, USA) e após esta etapa, anticorpos primários foram adicionados e os cortes incubados por 12-16h a 4°C. Para caracterização fenotípica e funcional do infiltrado inflamatório foram utilizados anticorpos primários para identificação de células, enzimas e citocinas. As informações sobre os anticorpos usados estão indicadas no quadro 1.

Anticorpo	Descrição	Concentração (µg/mL)	Marca	Diluição
CD4	Linfócitos T auxiliares	4,94	DAKO	1:100
CD8	Linfócitos T citotóxicos	1,57	DAKO	1:100
CD68	Macrófagos	0,79	DAKO	1:300
Triptase de Mastócito	Mastócitos	0,55	DAKO	1:100
Elastase neutrofílica	Neutrófilos	0,42	DAKO	1:100
CD56	Células natural killer (NK)	3,71	DAKO	1:100
Ki67	Marcador de proliferação celular	0,41	DAKO	1:100
NOS2	Óxido nítrico sintase do tipo 2	2,50	T cell transduction	1:100
CD25	Receptor de IL-2 (interleucina 2)	5,0	BD Pharmigen	1:100
<i>Leishmania</i> spp.	Amastigotas e antígenos de <i>Leishmania</i> spp.	-	Cedido por M. Madeira	1:500

Quadro 1 – Marcadores celulares e funcionais avaliados no presente estudo

As etapas seguintes consistiram em uma sequência de lavagens em PBS e incubações com: anticorpo secundário biotilado (Zymed), kit de marcação enzimática contendo streptavidina peroxidase (kit Dakocytomation) e kit de revelação AEC (Zymed). Após a última lavagem os tecidos foram contra corados com hematoxilina de Mayer (Dako) e cobertos com solução de montagem (Dakocytomation) e lamínula. A análise das lâminas foi feita com microscópio óptico (Nikon E-200, Nikon, Tóquio, Japão), e a porcentagem de células marcadas determinada através da contagem de 500 células ou 10 campos (aumento, X1000). Em alguns casos, foi utilizada lamínula milimetrada para o cálculo do infiltrado inflamatório por mm^2 de tecido. Em particular para NOS2 e algumas citocinas, a intensidade das marcações foi determinada da seguinte forma: discreto (1 sítio positivo por campo 20x), moderado (2 a 3 sítios positivos por campo), intenso (3 a 4 sítios positivos por campo) e muito intenso (5 ou mais sítios positivos por campo) (MORGADO *et al.*, 2008). O material foi registrado com um programa de captura de imagens (MoticImagesPlus 2.0, Motic China group Co., Ltd, China) e uma câmera Moticam 2300 (Motic China group Co., Ltd, China).

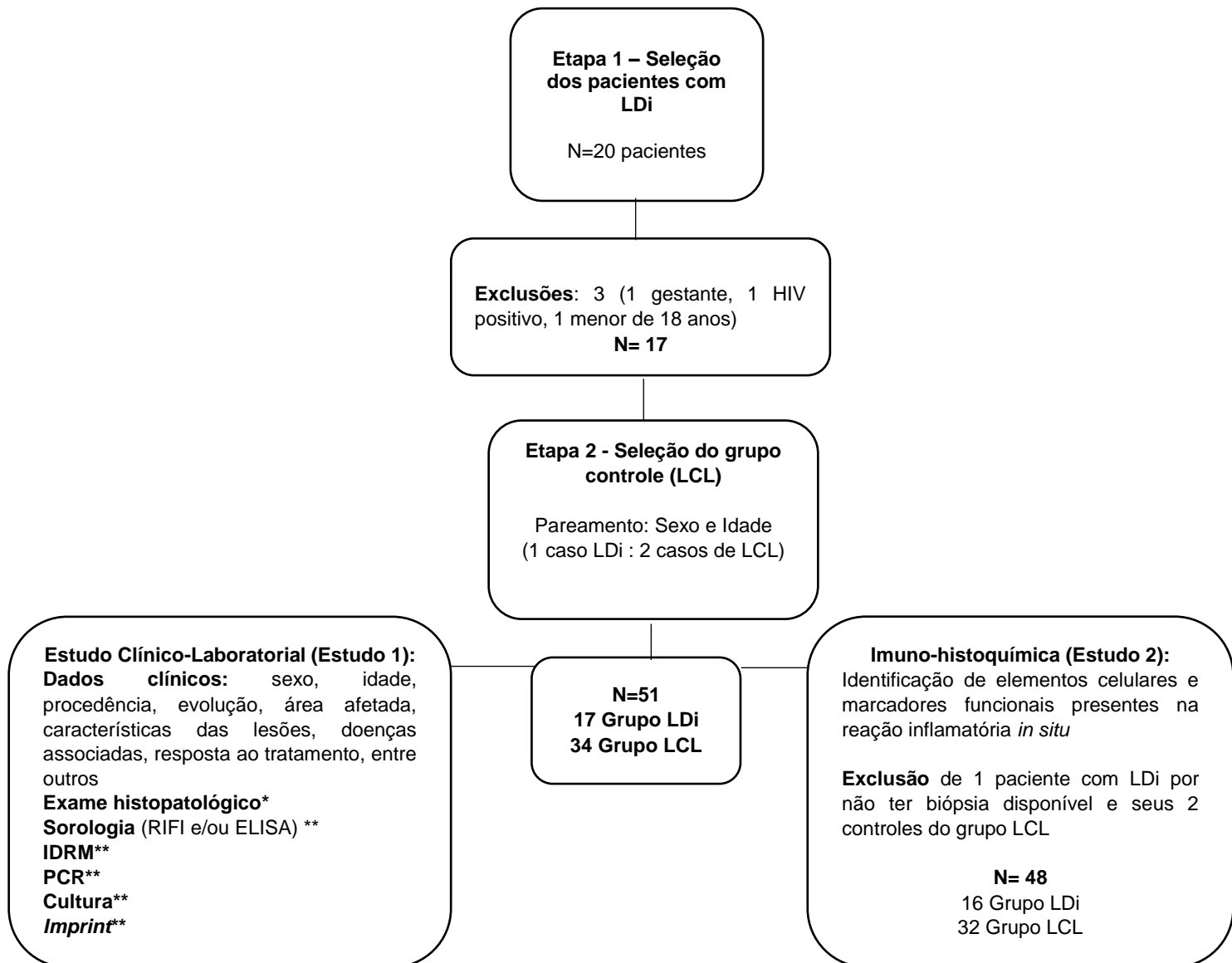
4.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foi construído banco de dados específico para o estudo utilizando-se o *software R*. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade das variáveis contínuas. As variáveis com distribuição não normal foram expressas pela mediana e intervalo mínimo e máximo, e a análise de seus resultados foi feita utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. As variáveis nominais foram apresentadas em valores absolutos e proporção, e foram analisadas em tabelas de contingência 2x2 através do Teste Exato de Fisher. O estudo dos resultados de imuno-histoquímica foi feito pela análise de amostras não relacionadas através do teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação de lesões de LDi com as lesões de LCL.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

O estudo foi realizado conforme as etapas descritas no fluxograma (Figura 9) a seguir:



* Estudo histopatológico com colaboração do laboratório de Anatomia Patológica do INI – Fiocruz

** Realizado no LapClinVigiLeish – INI – Fiocruz

Figura 9 – Fluxograma de inclusão de pacientes e etapas do estudo (Estudo comparativo das características clínicas e da resposta imune *in situ* entre pacientes com forma cutânea localizada e forma disseminada da leishmaniose tegumentar americana atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, 1989 a 2014)

5.1 AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E DE RESPOSTA AO TRATAMENTO DOS GRUPOS ESTUDADOS:

Neste estudo foram avaliados 51 pacientes divididos em dois grupos: 17 pacientes com leishmaniose cutânea disseminada (LDi) e 34 pacientes com leishmaniose cutânea localizada com lesão única (LCL), pareados por sexo e idade. Observou-se prevalência do sexo masculino (94,1%) nos dois grupos. No grupo de LDi a idade variou entre 25 a 58 anos (média $44,41 \pm 9,85$) e no grupo de LCL entre 22 a 59 anos (média $44,26 \pm 9,96$). O pareamento eficaz permitiu a comparação de outros parâmetros.

Dos 17 pacientes com LDi, 2 (11,8%) apresentavam hipertensão arterial sistêmica (HAS), 1 (5,9%) relato de alergia, 1 (5,9%) história de nefropatia, 1 (5,9%) história de neuropatia, 6 (35,3%) eram etilistas e 4 (23,5%) fumantes. Neste grupo não houve relato de diabetes, dislipidemia e hepatopatia. No grupo de LCL a prevalência de HAS foi de 20,6%, de diabetes e de dislipidemia foi de 5,9% cada, de hepatopatia 2,9% e a de alergia e nefropatia 3,9% cada. Não houve relato de neuropatia, etilismo e tabagismo. Não houve associação com comorbidades no grupo de LDi quando comparado com o grupo de LCL ($p = 0,073$, Teste exato de Fisher).

As características das lesões bem como sua distribuição encontram-se no quadro 2 e na tabela 1. O número de lesões no grupo de LDi variou de 11 a 167 lesões, com mediana de 22 lesões. A mediana do diâmetro da maior lesão no grupo LDi foi de 34,5 mm (1 a 150mm) e de 15,0mm (0,2 a 150mm) no grupo de LCL; houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo LDi a que apresentava lesões com diâmetros maiores ($p= 0,026$, Teste de Mann-Whitney). Quinze pacientes (88,2%) do grupo de LDi tiveram lesões localizadas na região cefálica, seguido em ordem de frequência, de lesões em pé/perna, tronco posterior, tronco anterior, coxa, membros superiores, mucosa e pescoço. Houve diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo de LCL, que apresentou maior frequência de lesões em pé/perna, embora localizações cefálicas, no pescoço, tronco e membros superiores também tenham ocorrido. Nove (52,9%) pacientes apresentaram lesão mucosa, em todos eles havia lesão em mucosa nasal.

Concomitante a lesão nasal, também foi verificada lesão em mucosa orofaríngea em 3 (33,3%) e em laringe em 2 (22,2%) casos (p-valores na Tabela 1).

Paciente/ Grupo	Tempo lesão (meses)	Diâmetro maior lesão (mm)	Coxa	Pé/ Perna	MMSS	Cabeça	Pescoço	Tronco anterior	Tronco posterior
1/LDi	6	6	-	-	+	-	-	-	-
2/LDi	2	1	+	+	+	+	+	+	+
3/LDi	3	25	+	+	+	+	+	+	+
4/LDi	2	20	-	-	-	+	+	-	+
5/LDi	6	25	-	-	-	-	-	+	+
6/LDi	1	45	-	+	+	+	-	-	-
7/LDi	3	33	+	+	-	+	-	+	+
8/LDi	3	65	+	+	-	+	+	+	+
9/LDi	1	10	+	+	+	+	+	+	+
10/LDi	2	70	+	+	-	+	-	+	+
11/LDi	3	60	+	+	+	+	-	+	+
12/LDi	5	NR	+	+	+	+	+	+	+
13/LDi	3	90	+	+	-	+	-	+	+
14/LDi	4	36	+	+	+	+	-	+	+
15/LDi	3	54	-	+	+	+	-	-	+
16/LDi	2	20	-	-	+	+	-	+	-
17/LDi	4	150	+	+	-	+	-	-	-
18/LCL	3	40	-	+	-	-	-	-	-
19/LCL	12	27	-	-	-	-	+	-	-
20/LCL	5	7	-	+	-	-	-	-	-
21/LCL	4	25	-	+	-	+	-	-	-
22/LCL	1	40	-	-	-	+	-	-	-
23/LCL	1	40	-	-	+	-	-	-	-
24/LCL	1,5	40	-	-	-	+	-	-	-
25/LCL	3	50	-	+	-	-	-	-	-
26/LCL	1,5	150	-	+	-	-	-	-	-
27/LCL	2	42	-	-	+	-	-	-	-
28/LCL	1	20	-	-	+	-	-	-	-
29/LCL	2	12	-	-	-	-	-	-	+
30/LCL	3	30	-	+	-	-	-	-	-
31/LCL	5	35	-	-	+	-	-	-	-
32/LCL	1	40	-	+	-	-	-	-	-
33/LCL	3	40	-	-	+	-	-	-	-

34/LCL	2	15	-	+	-	-	-	-	-
35/LCL	3	25	-	+	-	-	-	-	-
36/LCL	1,5	15	-	-	-	-	-	-	+
37/LCL	4	60	-	-	+	-	-	-	-
38/LCL	2	0,35	+	-	-	-	-	-	-
39/LCL	12	4	-	+	-	-	-	-	-
40/LCL	24	5	-	+	-	-	-	-	-
41/LCL	5	4	-	+	-	-	-	-	-
42/LCL	2	NR	-	+	-	-	-	-	-
43/LCL	2	1,9	-	-	-	-	+	-	-
44/LCL	4,5	1,9	-	+	-	-	-	-	-
45/LCL	1	0,2	-	-	+	-	-	-	-
46/LCL	3	2	-	+	-	-	-	-	-
47/LCL	2	3	-	-	-	-	-	+	-
48/LCL	4	3,5	-	-	+	-	-	-	-
49/LCL	3	0,65	-	-	-	-	-	-	+
50/LCL	1	2,5	-	-	+	-	-	-	-
51/LCL	1	5,5	-	-	-	-	-	-	+

Quadro 2 - Características das lesões dos pacientes de LDi e LCL

LDi: leishmaniose cutânea disseminada

LCL: leishmaniose cutânea localizada

MMSS: membros superiores

+: presente, -: ausente

NR: não relatado

Tabela 1 – Distribuição das características de lesão nos casos de LTA de acordo com o tipo de acometimento

Variável	LDi	LCL	p-valor
Tempo de evolução em meses / mediana (Min-Máx)	3,0 (1 a 6 meses)	2,5 (1 a 24 meses)	0,446 *
Diâmetro da maior lesão em milímetros/ mediana (Mín-Máx)	34,5 (1 a 150mm)	15,0 (0,2 a 150mm)	0,026 *
Localização das lesões***	Casos positivos/total de pacientes (%)		
MMII (coxa)	11/17 (64,7%)	1/34 (2,9%)	<0,01**
Pé/perna	13/17 (76,5%)	14/34 (41,2%)	0,039**
MMSS	10/17 (58,8%)	9/34 (26,5%)	0,034**
Cabeça	15/17 (88,2%)	3/34 (8,8%)	<0,01**
Pescoço	6/17 (35,3%)	2/34 (5,9%)	0,012**
Tronco anterior	12/17 (70,6%)	1/34 (2,9%)	<0,01**
Tronco posterior	13/17 (76,5%)	4/34 (11,8%)	<0,01**
Mucosa	9/17 (52,9%)	0	-

LDi: leishmaniose cutânea disseminada

LCL: leishmaniose cutânea localizada

MMII: membros inferiores, MMSS: membros superiores

* Teste Mann-Whitney

** Teste exato de Fisher

*** Dependendo do paciente poderia haver lesões em mais de um local

No quadro 3 estão listados os resultados dos exames diagnósticos utilizados nos casos de LTA. Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos, observamos que em relação à positividade dos exames diagnósticos há uma tendência a ser maior no grupo de LDi (Tabela 2).

Paciente	Grupo	IMPRINT	Cultura	Histopatológico	PCR	Sorologia	IDRM (mm)
1	LDi	+	+	PIG + PIC	NR	+	40
2	LDi	-	+	PIG + PIC + amastigotas	NR	+	20
3	LDi	+	+	PIG + PIC	NR	+	16
4	LDi	+	+	Incompatível	NR	+	8
5	LDi	+	+	PIC + amastigotas	NR	+	19
6	LDi	-	+	PIG + PIC	NR	+	22
7	LDi	NR	+	PIG + PIC + amastigotas	NR	+	27
8	LDi	-	+	PIG + PIC + amastigotas	+	+	8
9	LDi	-	+	PIG + PIC	+	NR	20
10	LDi	-	+	PIG + PIC	+	+	15
11	LDi	-	+	PIC + amastigotas	+	+	9
12	LDi	-	+	PIG	+	+	9
13	LDi	+	+	PIG + amastigotas	+	+	NR
14	LDi	NR	+	PIG + PIC	+	+	NR
15	LDi	NR	+	PIG	+	+	10
16	LDi	-	-	PIG + amastigotas	-	+	15
17	LDi	NR	+	PIG + PIC + amastigotas	+	+	10
18	LCL	-	+	PIG + PIC	NR	+	50
19	LCL	NR	-	PIG + PIC	+	+	12
20	LCL	-	+	PIG + PIC	+	+	21
21	LCL	NR	+	PIG	NR	+	16

22	LCL	-	+	PIG + PIC + amastigotas	NR	+	18
23	LCL	NR	+	PIC + amastigotas	NR	+	10
24	LCL	NR	+	PIC + amastigotas	NR	+	30
25	LCL	-	+	NR	NR	+	NR
26	LCL	-	-	PIC	+	+	Não reator
27	LCL	+	+	PIG	NR	+	23
28	LCL	+	+	NR	NR	+	NR
29	LCL	+	+	PIG + amastigotas	+	+	15
30	LCL	+	+	PIG + amastigotas	NR	+	22
31	LCL	NR	-	PIG + PIC + amastigotas	NR	+	NR
32	LCL	NR	+	PIG	+	+	15
33	LCL	-	+	PIG + PIC	NR	+	30
34	LCL	+	+	PIG + PIC + amastigotas	NR	+	20
35	LCL	+	+	PIG + PIC	NR	-	15
36	LCL	-	-	PIG	+	+	13
37	LCL	NR	+	PIG + PIC + amastigotas	+	+	11
38	LCL	NR	+	PIC	NR	-	12
39	LCL	-	+	PIG + amastigotas	NR	-	NR
40	LCL	+	+	PIC + amastigotas	NR	+	11
41	LCL	+	+	PIC + amastigotas	NR	+	14
42	LCL	-	-	PIG + amastigotas	NR	+	Não reator
43	LCL	-	+	PIG + amastigotas	+	+	19

44	LCL	-	+	PIG + PIC	NR	+	20
45	LCL	+	+	PIG + PIC	NR	+	23
46	LCL	-	-	PIG + amastigotas	-	+	9
47	LCL	-	+	PIG + PIC	NR	+	19
48	LCL	-	-	PIG + PIC	-	+	37
49	LCL	NR	+	PIG	+	+	16
50	LCL	NR	+	PIG + amastigotas	+	+	5
51	LCL	NR	+	PIG + amastigotas	+	+	26

Quadro 3 – Distribuição dos resultados dos exames diagnósticos utilizados para cada paciente com LTA

LDi: leishmaniose cutânea disseminada

LCL: leishmaniose cutânea localizada

IDRM: intradermoreação de Montenegro

PCR: reação em cadeia de polimerase

PIG: processo inflamatório granulomatoso

PIC: processo inflamatório crônico

NR: não realizado

+: positivo, -: negativo

O imprint foi positivo em 38,5% no grupo LDi e em 39,1% no grupo LCL. O isolamento do parasito em cultivo foi realizado em todos os pacientes, com positividade de 94,1% no grupo LDi e 79,4% no grupo LCL. A sorologia foi realizada em todos os pacientes do grupo de LCL, com positividade de 91,2%, e no grupo de LDi apenas 1 paciente não realizou o exame, sendo positivo em 100% dos que realizaram. A IDRM foi positiva em 100% do grupo LDi, com mediana de 15mm (variação de 8 a 40mm), em comparação com os casos de LCL que tiveram 93,3% de positividade e mediana de 17,00mm (variação de 5 a 50mm). A presença de *Leishmania* spp no exame histopatológico foi positiva em 41,2% em LDi e 46,9% em LCL. A PCR foi positiva em 90% dos pacientes de LDi e em 84,6% de LCL. Não

houve diferença estatisticamente significativa no percentual dos exames positivos entre os dois grupos (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Distribuição da positividade dos exames usados para o diagnóstico de LTA nos pacientes estudados de acordo com a forma clínica

Exames	LDi (n=17)	LCL (n=34)	p-valor
<i>Imprint</i>	5/13 (38,5%)	9/23 (39,1%)	1**
Cultura	16/17 (94,1%)	27/34 (79,4%)	0,242 **
Presença <i>Leishmania spp</i> no Histopatológico	7/17 (41,2%)	15/32 (46,9%)	0,790 **
Sorologia	16/16 (100%)	31/34 (91,2%)	0,542 **
PCR	9/10 (90,0%)	11/13 (84,6%)	1 **
IDRM	15/15 (100%) 15,0mm (8 a 40mm)	28/30 (93,3%) 17mm (5 a 50mm)	0,284*

LDi: leishmaniose cutânea disseminada

LCL: leishmaniose cutânea localizada

IDRM: intradermoreação de Montenegro

PCR: reação em cadeia de polimerase

* Teste não paramétrico de Mann-Whitney

** Teste exato de Fisher

Tabela 3 – Número de exames parasitológicos positivos de acordo com a forma clínica de LTA

	LDi (n=17)	LCL (n=34)	p-valor
Até 1	3 (17,6%)	14 (41,2%)	0,1221*
2 ou mais	14 (82,4%)	20 (58,8%)	

LDi: leishmaniose cutânea disseminada

LCL: leishmaniose cutânea localizada

* Teste exato de Fisher

Dos 34 pacientes do grupo LCL, 31 (91,2%) foram tratados com antimoniato de meglumina evoluindo para cura. Os outros 3 (8,8%) obtiveram cura espontânea das lesões, não recebendo tratamento específico. Os pacientes de cura espontânea no grupo de LCL tiveram a infecção confirmada por PCR (2 casos) ou presença de amastigota no exame histopatológico (1 caso). Todos os 34 pacientes de LCL evoluíram para cura (100%) e no acompanhamento pós-tratamento não houve sinal de reativação das lesões ou comprometimento de tecido mucoso.

No grupo de LDi, todos pacientes também foram tratados inicialmente com antimoniato de meglumina (AM). No entanto, em 7 (41,2%) houve insucesso terapêutico, sendo necessário um segundo tratamento. Dos 7 que foram tratados pela segunda vez, 6 receberam um segundo ciclo de AM e 1 paciente foi tratado com anfotericina B por apresentar efeitos adversos ao antimonial pentavalente. O paciente tratado com anfotericina B evoluiu para cura sem necessidade de outros ciclos de tratamento. Contudo, após o segundo ciclo de tratamento com AM, 2 (33,3% dos pacientes que receberam o segundo ciclo de AM e 28,6% do total) apresentaram novo insucesso terapêutico e foi necessário tratá-los com anfotericina B, evoluindo então para cura das lesões. Estes dois pacientes tinham sido tratados com antimonial pentavalente por dois ciclos (Tabela 4).

A comparação do desfecho obtido com o tratamento inicial identificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 5), indicando que os pacientes LDi apresentaram uma menor taxa de sucesso terapêutico com o primeiro ciclo de tratamento com antimoniato de meglumina.

Tabela 4 – Resposta ao tratamento nos dois grupos avaliados constituídos por pacientes apresentando leishmaniose cutânea disseminada (LDi) e leishmaniose cutânea localizada (LCL). INI – FIOCRUZ – 1989 a 2014

	LDi	LCL
Primeiro tratamento		
Antimoniato meglumina IM	17/17 (100%)	31/34 (91,2%)
Nenhum (cura espontânea)	0	3/34 (8,8%)
Primeiro Desfecho		
Cura	10/17 (58,8%)	34/34 (100%)
Insucesso	7/17 (41,2%)	
Segundo tratamento		
Antimoniato meglumina IM	6/7 (85,7%)	-
Anfotericina B	1/7 (14,3%)	-
Segundo Desfecho		
Cura	5/7 (71,4%)	-
Falha	2/7 (28,6%)	-
Terceiro tratamento		
Anfotericina B	2/2 (100%)	-
Terceiro Desfecho		
Cura	2/2 (100%)	-

LDi: leishmaniose cutânea disseminada

LCL: leishmaniose cutânea localizada

Dos 17 pacientes de LDi que receberam AM como primeiro tratamento, 7 (41,2%) tiveram insucesso terapêutico. Cinco desses pacientes apresentavam comorbidades como hipertensão arterial sistêmica, diabetes melitus, nefropatia, etilismo e tabagismo, em 3 havia comprometimento de mucosas, e em 3 o número de lesões era incontável.

Tabela 5 – Distribuição da resposta terapêutica inicial nos casos de LTA avaliados constituídos por pacientes apresentando leishmaniose cutânea disseminada (LDi) e leishmaniose cutânea localizada (LCL). INI – FIOCRUZ – 1989 a 2014

Primeiro Desfecho	LDi	LCL	p-valor
Cura	10/17 (58,8%)	34/34 (100%)	< 0,01
Insucesso	7/17 (41,2%)	0	

LDi: leishmaniose cutânea disseminada

LCL: leishmaniose cutânea localizada

p-valor calculado pelo Teste Exato de Fisher

5.2 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES CELULARES E FUNCIONAIS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA *IN SITU* DAS LESÕES DE LTA

A imuno-histoquímica das lesões ativas de LCL e LDi permitiu a identificação de células e marcadores do infiltrado inflamatório *in situ* como pode ser visualizado nas figuras 10 e 11.

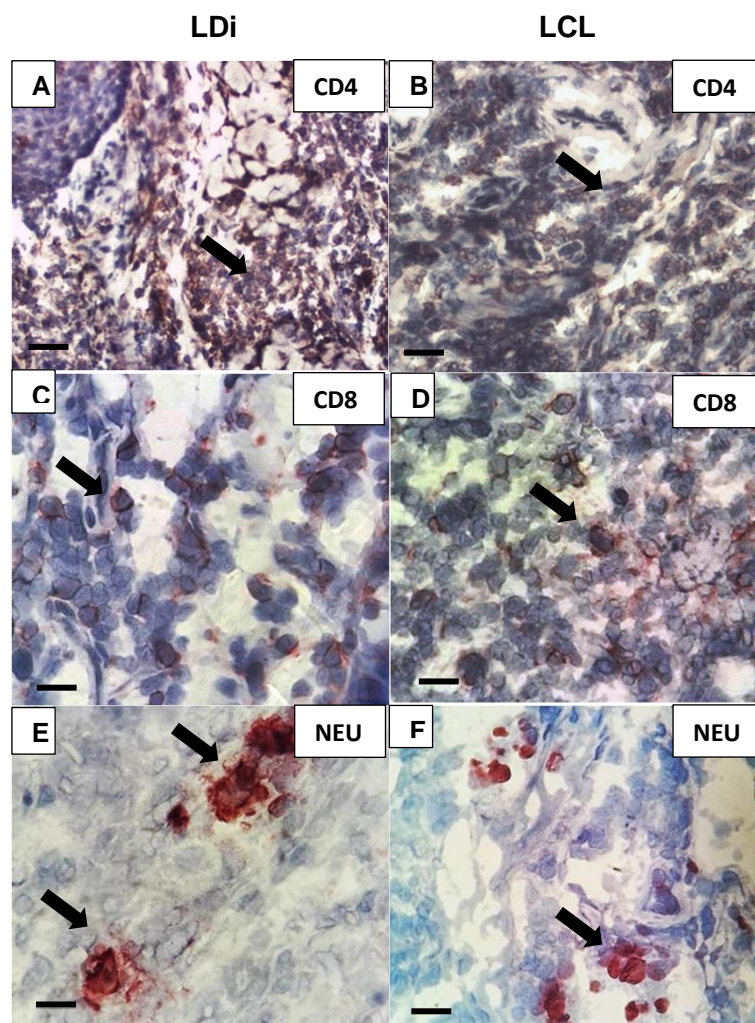


Figura 10 - Avaliação da resposta inflamatória *in situ* por imuno-histoquímica no grupo LDi e grupo LCL. Marcações positivas em castanho-enequizado (setas). (A) e (B) células T CD4. (C) e (D) células T CD8. (E) e (F) Neutrófilos. (A) e (B) Barra de aumento: 50 μ m; (C) a (F) Barra de aumento: 10 μ m.

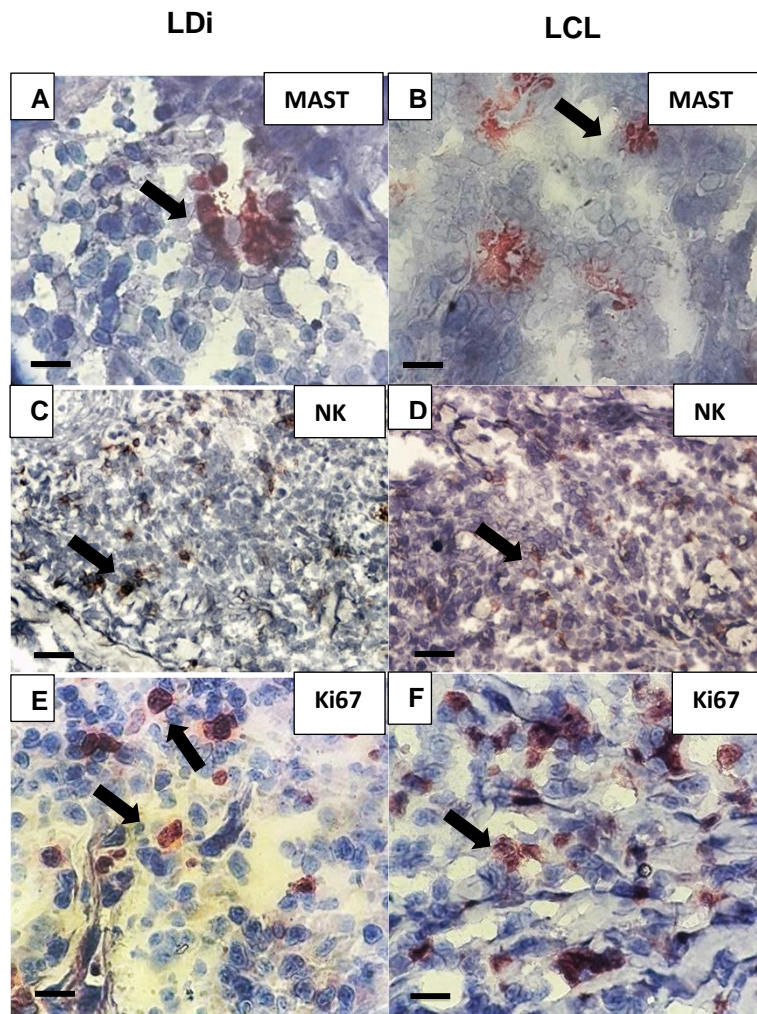


Figura 11 - Avaliação da resposta inflamatória *in situ* por imuno-histoquímica no grupo LDi e grupo LCL. Marcações positivas em castanho-enegecido (setas). (A) e (B) Mastócitos. (C) e (D) células NK. (E) e (F) Ki67. (A), (B), (E) e (F) Barra de aumento: 10 μ m; (C) e (D) Barra de aumento: 50 μ m.

As concentrações das células e NOS2 no processo inflamatório nas lesões ativas de LDi e LCL estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Contagem percentual dos marcadores estudados nos sítios de lesões cutâneas do grupo de leishmaniose cutânea disseminada (LDi) em comparação ao grupo de leishmaniose cutânea localizada (LCL).

Marcador	LDi % Mediana (Mín-Máx)	LCL % Mediana (Mín-Máx)	p-valor
CD4	26,00 (19,09 – 33,50)	29,38 (21,20 – 50,00)	0,00705 *
CD8	27,04 (19,21 – 35,00)	29,20 (17,28 – 36,72)	0,4 *
CD25	20,13 (9,80 – 35,54)	10,63 (4,30 – 25,31)	0,0221 *
Ki67	16,80 (10,80 – 23,37)	16,75 (3,71 – 24,12)	0,747 *
MACRÓFAGO	26,31 (18,36 – 41,60)	23,77 (17,80 – 52,48)	0,445*
MASTÓCITO	4,48 (2,10 – 6,60)	6,67 (2,00 – 13,00)	0,0229 *
NEUTRÓFILO	11,80 (6,49 – 21,40)	14,60 (6,52 – 27,20)	0,271 *
NK	16,27 (8,80 – 33,52)	13,43 (6,39 – 29,23)	0,172 *
NOS2			
Discreto	3/15 (20,0%)	2/11 (18,2%)	0,876**
Moderado	8/15 (53,3%)	5/11 (45,5%)	
Intenso	4/15 (26,7%)	4/11 (36,4%)	
Muito Intenso	0	0	
Anti <i>Leishmania</i> spp	0 (0 – 0,67)	0,04 (0 – 0,25)	0,428*

* p-valor calculado por teste de Mann-Whitney

** p-valor calculado por Teste Exato de Fisher

LDi: leishmaniose cutânea disseminada

LCL: leishmaniose cutânea localizada

Discreto (1 sítio positivo por campo 20x)

Moderado (2 a 3 sítios positivos por campo 20x),

Intenso (4 sítios positivos por campo 20x)

Muito Intenso (5 ou mais sítios positivos por campo 20x)

Não houve diferença significativa entre as concentrações de CD8, Ki67, Macrófago, Neutrófilo, NK, NOS2 e anti-*Leishmania* spp. No entanto, como pode ser observado nas figuras 12 e 13, os pacientes de LCL apresentaram maior número de

CD4 ($p = 0,00705$) e mastócito ($p = 0,0229$) e os pacientes de LDi apresentaram maior concentração de células CD25⁺ ($p = 0,0221$) (Tabela 6 e figuras 12 e 13).

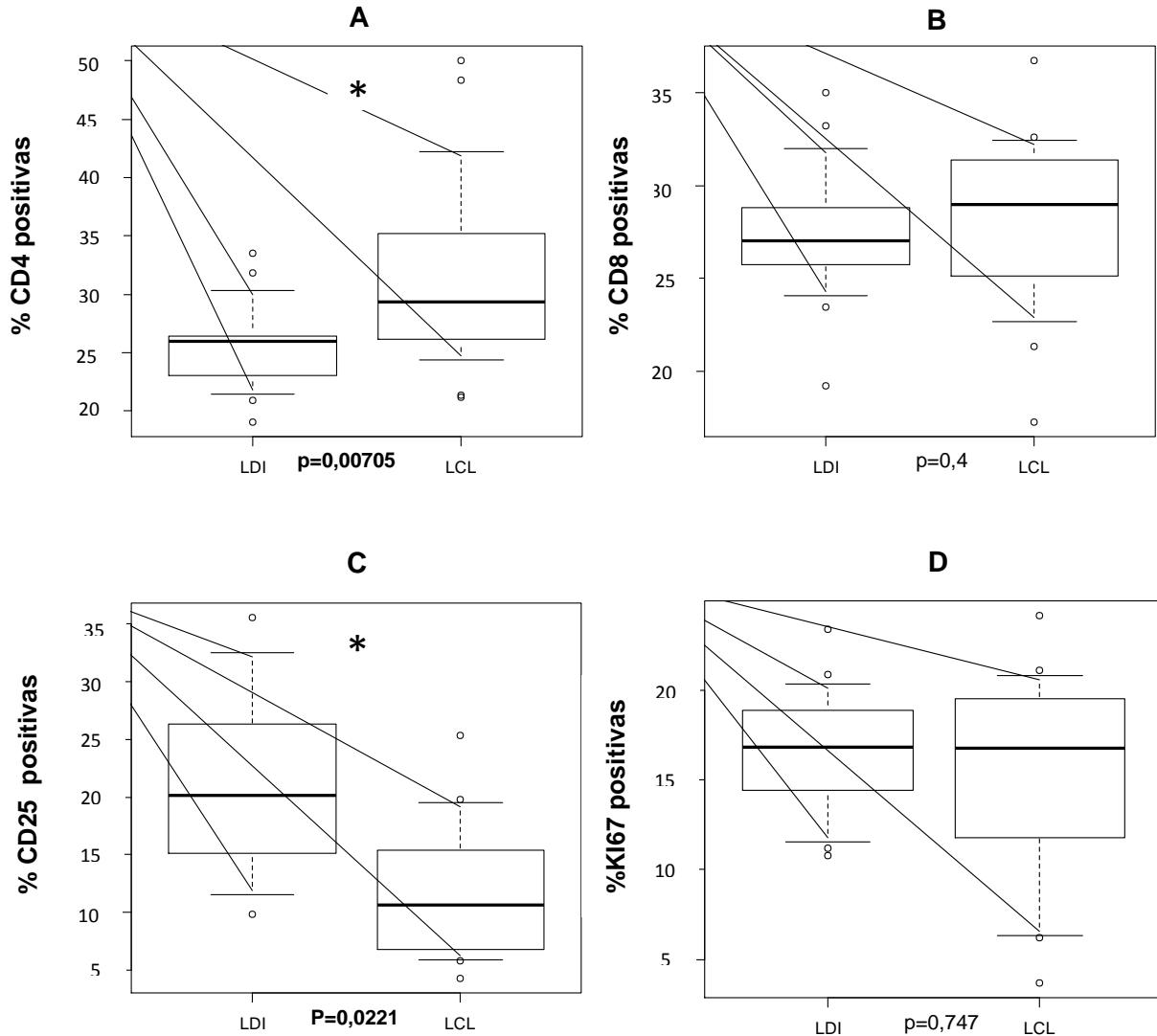


Figura 12: Contagem percentual dos marcadores estudados nas lesões cutâneas de leishmaniose disseminada (LDi) em comparação às de leishmaniose cutânea localizada (LCL). (A) CD4, (B) CD8, (C) CD25 e (D) KI67. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. *: p-valores significativos.

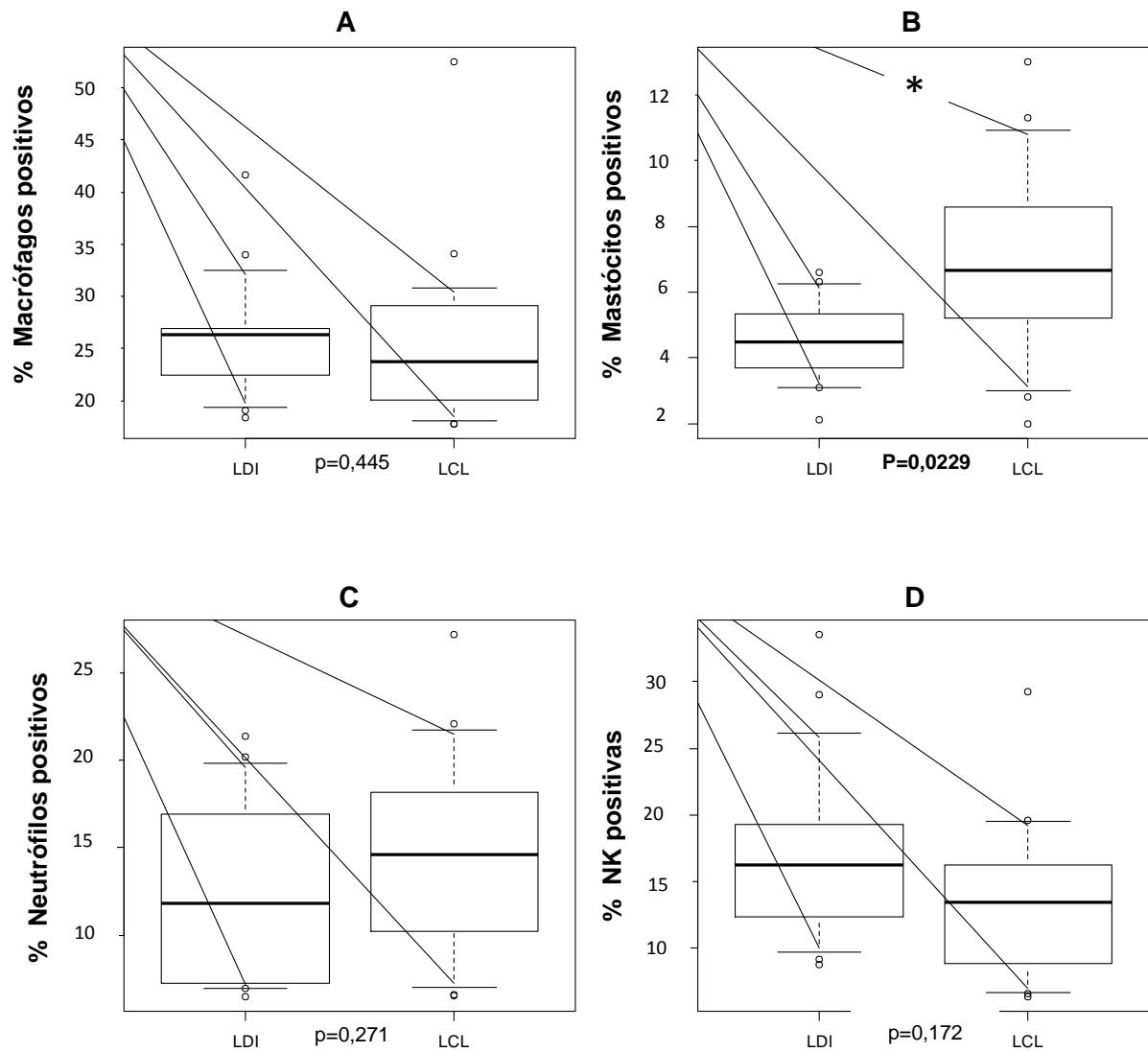


Figura 13: Contagem percentual dos marcadores estudados nas lesões cutâneas de leishmaniose disseminada (LDi) em comparação às de leishmaniose cutânea localizada (LCL). (A) macrófagos, (B) mastócitos, (C) neutrófilos e (D) NK. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. *: p-valor significativo.

6 DISCUSSÃO

Avaliamos os pacientes de LDi atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses do INI-Fiocruz, no período de 1984 a 2014, e verificamos que, houve predominância do sexo masculino (94,1%) com média de idade de 44 anos, percentual maior que o relatado pelo Ministério da saúde para casos de LTA no Brasil (74% de casos em homens, sendo 92,5% do total de casos em maiores de 10 anos) (BRASIL, 2017).

A quantidade de lesões no grupo de LDi foi bastante variável (11 a 167) fato que já foi descrito na literatura (TURETZ *et al.*, 2002). Em relação às características das lesões, a mediana do diâmetro da maior lesão no grupo de LDi foi significativamente superior à mediana do grupo de LCL (34,5mm e 15,0mm respectivamente - $p = 0,026$). O achado está de acordo com os resultados encontrados por Turetz *et al.* (2002). Mas avaliações mais detalhadas são necessárias para esclarecer esta diferença. Houve predomínio das lesões na cabeça diferente do relatado por Turetz *et al.* (2002), em que o predomínio das lesões foi no tronco. Já no grupo de LCL a localização predominante foi nas pernas, o que está em acordo com o relatado por este mesmo autor e dados publicados em casuística do Rio de Janeiro (VASCONCELLOS *et al.*, 2010; SCHUBACH *et al.*, 2005), e em desacordo com o relatado por Morgado *et al.* (2008), que evidenciaram lesões mais frequentes em membros superiores. Esta situação pode ser devida ao fato de que diferente do nosso estudo em que avaliamos apenas pacientes LCL com lesão única, o grupo Morgado *et al.* (2008) inclui pacientes com LCL com lesões múltiplas, variando de 1 a 6 lesões.

Todos os pacientes com LCL submetidos ao primeiro tratamento com antimoniato de meglumina foram curados, diferente do grupo de LDi em que 41,2%

apresentaram insucesso terapêutico, sendo necessário um segundo tratamento com o AM ou uso de medicamento de segunda linha, como anfotericina B. A comparação dos percentuais de cura após o primeiro ciclo de tratamento evidenciou uma diferença significativa. Em 28,6% (2 casos) dos pacientes com LDi foi ainda necessário um terceiro tratamento para que a cura fosse alcançada. A falha terapêutica em LDi é tema controverso com autores relatando boa resposta ao tratamento (CARVALHO *et al.*, 1994) e outros relatando alta incidência de insucesso (TURETZ *et al.*, 2002). Neste sentido, Machado *et al.* (2011) relataram falha terapêutica em 76% dos casos de LDi estudados. Essas diferenças na evolução para cura podem ser devidas a diversos fatores como características genéticas e ambientais da população avaliada, bem como aos critérios para avaliação dos desfechos de cura. A influência de fatores genéticos na evolução da LTA é de difícil comprovação devido à alta miscigenação da população brasileira (COVAS *et al.*, 2010). As diferenças na evolução para cura também podem ser devidas a condições populacionais, como por exemplo, incidência de etilismo, comorbidades e desnutrição (FARAH; KLAUS; FRANKENBURG; 1993) ou mesmo a características do parasito envolvido (SCHRIEFER *et al.*, 2009). No presente estudo não foi possível avaliar a diversidade genética dos parasitos isolados dos casos de LDi, mas dados da literatura apontam para uma grande homogeneidade dos parasitos isolados no Rio de Janeiro, não importando a forma clínica apresentada pelos pacientes (BAPTISTA *et al.*, 2009).

Apesar de não haver diferença estatística, houve uma tendência no grupo de LDi de apresentar mais comorbidades como alergias, nefropatia, neuropatia, etilismo e tabagismo. Alguns autores relatam alterações na evolução da LTA de acordo com

a idade e a presença de comorbidades (ANTONIO *et al.*, 2014), mas nossos resultados não corroboraram esta informação.

A distribuição da positividade dos exames laboratoriais foi semelhante entre os dois grupos, havendo uma tendência do grupo de LDi apresentar mais exames parasitológicos positivos. Não foi possível caracterizar os isolados obtidos nos casos de LDi. Neste contexto, resultados obtidos na região sul do estado da Bahia, demonstraram uma diferença no perfil dos isolados de casos de LDi, mas este achado não é encontrado em todos os casos de LDi identificados na literatura (SCHRIEFER *et al.*, 2009).

Apesar das diferenças observadas nos dois grupos estudados, os resultados obtidos ainda não permitem caracterizar fatores clínicos e laboratoriais que pudessem influenciar ou determinar a evolução da LTA para a forma disseminada da infecção. Desta forma, outras abordagens/características são necessárias para uma possível distinção entre os dois grupos estudados. Como o processo inflamatório desenvolvido no microambiente das lesões tem sido implicado como importante fator na evolução das lesões para cura ou agravamento, decidimos verificar alguns componentes do processo inflamatório nas lesões dos casos de LCL e LDi.

A composição do processo inflamatório na LCL tem sido amplamente estudada, e os achados obtidos no presente estudo estão de acordo com dados da literatura (ESTERRE *et al.*, 1992; PIRMEZ *et al.*, 1993; MORGADO *et al.*, 2008; CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 2010; CASTRO GOMES *et al.*, 2017). Já os casos de LDi são menos estudados, talvez devido ao pequeno número de casos diagnosticados. Em adição, existe controvérsia sobre a capacidade de resposta imune na LDi, com autores relatando casos de resposta imune específica insuficiente (CARVALHO *et al.*, 1994) e outros relatando resposta imune específica semelhante a pacientes com

outras apresentações clínicas (VIEIRA GONÇALVES *et al.*, 2008). Nos pacientes por nós estudados não houve indício de resposta imune reduzida à presença da infecção. Todos os pacientes apresentavam IDRM positiva e a grande maioria (88,23%) apresentou boa resposta ao tratamento. Os dois casos com insucesso terapêutico após um curso de tratamento com AM que precisaram ser tratados com anfotericina B se curaram após um ciclo de uso. A resposta terapêutica ainda é motivo de controvérsia na literatura, mas os casos aqui avaliados não apresentaram perfil de resposta terapêutica diferente do que é comumente encontrado para literatura para LTA (BRASIL, 2017). Apesar de termos encontrado uma diferença estatisticamente significativa de sucesso da terapia com antimoniato de meglumina no primeiro ciclo de tratamento entre os dois grupos estudados, a repetição do esquema e/ou a utilização de anfotericina B promoveram a cura em todos os casos de LDi.

Na comparação da resposta imune *in situ* por técnica de imuno-histoquímica, ao avaliar os marcadores celulares encontramos um predomínio no grupo LDi de linfócitos T CD8, seguido em ordem de frequência, por macrófagos, T CD4, NK, neutrófilos e mastócitos. No grupo LCL houve predomínio de linfócitos T CD4, seguido por T CD8, macrófagos, neutrófilos, NK e mastócitos. Observamos que os linfócitos T e os macrófagos foram as células mais encontradas em ambos os grupos, como evidenciado por Vieira *et al.* (2002) e outros autores (MORGADO, 2008; MENDES *et al.*, 2013). No entanto, os pacientes com LCL apresentaram maior número percentual de linfócitos T CD4 em relação aos de LDi ($p = 0,00705$), o que vai ao encontro dos achados por Dantas *et al.* (2014), e maior percentual de mastócitos ($p = 0,0229$) também identificado anteriormente em LCL (OLIVEIRA *et al.*, 2005). A maior concentração de mastócitos nas lesões de LCL poderia estar

relacionada ao equilíbrio da resposta imune nessas lesões. Essas células são produtoras de IL-4 e por isso poderiam ter um papel na regulação da resposta imune por diminuir ou regular a resposta Th1, o que já foi sugerido por Oliveira *et al.* (2005). Por outro lado, a diminuição de mastócitos nas lesões de LDi poderia facilitar uma resposta imune mais exacerbada, mas para confirmar essa possibilidade outras análises precisariam ser feitas. Em contrapartida, estudos experimentais recentes não confirmaram a importância de mastócitos como produtores de IL-4. Nesses estudos a comparação de duas cepas de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *L. major* não mostrou diferença na evolução e no tamanho das lesões (PAUL *et al.* 2016). Dessa forma, a função real de mastócitos ainda precisa de outros estudos para ser confirmada. Verificando os componentes celulares, observamos que as porcentagens de CD8⁺, NK, macrófagos e neutrófilos são iguais nos dois grupos estudados e que CD4 e mastócitos estão diminuídos em LDi. Este fato pode indicar a presença de outras populações celulares não detectadas pelos marcadores utilizados no presente estudo. Uma possibilidade são as células T duplo negativas (CD3⁺CD4⁻CD8⁻), já identificadas em altas concentrações em lesões de leishmaniose cutânea (FERRAZ *et al.*, 2017).

Na avaliação do marcador funcional CD25, os pacientes com LDi apresentaram percentuais significativamente maiores que os de LCL ($p = 0,0221$). CD25 é proteína constituinte do receptor para IL-2 e está relacionada ao início da resposta proliferativa a partir de ligação de IL-2 (SAKAGUCHI *et al.*, 1995). Contudo, quando expresso concomitantemente ao marcador Foxp3 indica a presença de células T regulatórias (BELKAID *et al.*, 2003). No presente estudo não foi possível a verificação de Foxp3, mas esta possibilidade precisa ser estudada no futuro.

A análise dos marcadores funcionais de ativação [Ki67 (marcador de proliferação celular) e NOS2 - enzima responsável pela produção de óxido nítrico] não mostrou diferença entre os grupos. Já foi verificado por Morgado e colaboradores (2008) que em LCL, Ki67 está ligado a maior atividade da doença e que o aumento de NOS2 está ligado a menor presença de parasitas, sugerindo o controle do mesmo. Em conjunto, com os marcadores usados neste trabalho, não foi possível evidenciar diferenças no microambiente das lesões que pudessem explicar as diferenças na evolução de LCL e LDi. Outros marcadores deverão ser avaliados para formar um painel mais completo da organização do processo inflamatório da LDi.

Chamou-nos a atenção a semelhança entre os dados de presença de parasitos detectados pela imuno-histoquímica nos pacientes avaliados. Como a biópsia é uma técnica pontual em que apenas um pequeno fragmento de lesão é obtido, e sabendo-se que o parasito se distribui de forma heterogênea no tecido das lesões, a grande variação de resultados obtidos não foi surpresa, já tendo sido verificado em outros estudos (MORGADO *et al.*, 2010). Assim, a variação de concentração de parasitos no tecido pode não ser reflexo da carga parasitária total, mas apenas uma função do local de realização da biópsia. Alguns autores sugerem ainda que, na presença de uma resposta inflamatória eficiente, o número de parasitos pode variar de acordo com a capacidade de eliminação dos mesmos (VIEIRA-GONÇALVES *et al.*, 2008; VERNAL *et al.*, 2015).

A LDi é uma apresentação clínica que pode variar tanto no acometimento ou não de mucosas (TURETZ *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2011) quanto na resposta ao tratamento (CARVALHO *et al.*, 1994; VIEIRA *et al.*, 2002). A apresentação clínica de múltiplas lesões (≥ 10), de diferentes morfologias, faz da LDi uma apresentação

única da LTA. O grupo de LDi por nós avaliado teve 52,9% de acometimento de mucosa, que vai de acordo com o encontrado por Vieira *et al.* (2002) e se opõe ao relatado por Turetz *et al.* (2002) em que o comprometimento de mucosas ocorreu em 28,3% dos pacientes com LDi. Dos pacientes com LDi avaliados, 58,8% tiveram boa resposta terapêutica com um ciclo do AM, valores maiores do que os relatados por Turetz *et al.* (2002) que constatou 40% de cura com apenas um ciclo do tratamento. Variações dentro de um mesmo grupo podem acontecer de acordo com perfil imunológico/patogênico dos pacientes e de características do parasito. Como as características das populações estudadas nos diferentes artigos podem variar, os dados encontrados são difíceis de serem comparados. Avaliações mais detalhadas das condições clínicas e ambientais dos grupos, assim como características dos parasitos envolvidos poderiam elucidar algumas questões que permanecem em aberto.

Resumindo, obtivemos algumas características clínicas e do processo inflamatório *in situ* que diferiram quando LCL e LDi eram comparados. No entanto, nenhum deles foi suficiente para distinguir de forma clara as duas apresentações clínicas da LTA. Assim, com base nos dados atuais ainda não foi possível a elucidação de fatores que influenciariam a evolução da LTA para LDi. Outros marcadores inflamatórios e parâmetros clínicos deverão ser avaliados para a melhor compreensão da dinâmica da evolução da LDi.

7 CONCLUSÕES

1- Os pacientes de LDi eram predominantemente do sexo masculino, com acometimento de cabeça, o que é menos verificado nos casos de LCL. Além disto, pacientes com LDi apresentavam lesões de mucosa e alguns relataram etilismo (35,3%) e tabagismo (23,5%), que não foram relatados nos casos de LCL. No entanto, esses achados não são suficientes para identificar casos de LDi.

2- Não verificamos diferenças na positividade de exames parasitológicos, IDRMs e sorologia entre os dois grupos avaliados. Assim, os exames comumente usados no diagnóstico de LTA não são suficientes para prever o desenvolvimento da evolução de LTA para a forma LDi.

3- Também não foi verificada uma diferença importante na resposta terapêutica, apesar do maior número de casos de insucesso terapêutico nos casos de LDi. Este fato pode ser devido ao maior número de lesões e ao acometimento das mucosas. Como a literatura reporta a possibilidade de dificuldade de curar a LDi, os profissionais de saúde devem estar atentos à evolução da resposta terapêutica na LDi para intervir precocemente e adaptar o esquema terapêutico utilizado.

4- Alguns marcadores de atividade inflamatória foram investigados. As concentrações de CD8, Ki67, macrófago, neutrófilo, NK e NOS2 foram semelhantes nos dois grupos. No entanto, LCL apresentou maior concentração de CD4 e mastócitos e LDi apresentou maior número de células CD25⁺. Esses resultados sugerem uma atividade inflamatória mais evidente nas lesões dos casos de LDi. Outros marcadores deverão ser avaliados para verificar possíveis características do processo inflamatório *in situ* que possam indicar os mecanismos que influenciam a evolução de LTA para LDi.

5- Resumindo, obtivemos algumas características clínicas e do processo inflamatório que diferiram quando os dois grupos foram comparados. No entanto, nenhum deles foi suficiente, isoladamente ou em conjunto, para distinguir de forma clara LCL de LDi.

8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Celular e Molecular*. Editora Elsevier, 8ª edição, 2015.
- AGHAEI, S.; SALMANPOUR, R.; HANDJANI, F. *et al.* Ulcerated disseminated cutaneous leishmaniasis associated with vitiligo, hypothyroidism, and diabetes mellitus in a patient with Down syndrome. *Dermatol Online J.* 2004;10(2):21.
- AMATO, V.S.; ANDRADE, H.F, DUARTE, M.I. Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop.* 2003; 85 (1): 39 – 49.
- AMATO, V.S.; RABELLO, A.; ROTONDO-SILVA, A. *et al.* Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with lipid formulations of amphotericin B in two immunocompromised patients. *Acta Tropica.* 2004; 92 (2): 127 – 132.
- AMATO, V. S.; TUON, F.F.; NICODEMO, A.C. *et al.* Histopathology of mast cells and cytokines during healing of human mucosal leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 30(11-12): 637-640, 2008.
- ANTONIO, L.F.; FAGUNDES, A.; OLIVEIRA, R.V.C. *et al.* Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 56(5): 375-80, 2014.
- AZEREDO-COUTINHO, R.B.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, A. *et al.* First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2007; 101: 735-7
- AZEREDO-COUTINHO, R.B.; MENDONÇA, S.C.F. Formas Clínicas das Leishmanioses Tegumentares nas Américas. *In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R.* (Ed). *Leishmanioses do Continente Americano*. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. p. 311-326
- BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 2002; 70 (12): 6734-40.
- BAPTISTA, C.; SCHUBACH, A.O.; MADEIRA, M.F. *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *ExpParasitol* 2009; 121 (4): 317-22.

BARI, A.; RAHMAN, S. Correlation of clinical, histopathological, and microbiological findings in 60 cases of cutaneous leishmaniasis. *Indian J DermatolVenereolLepr.* 2006; 72: 28-32.

BELKAID, Y.; VON STEBUT, E.; MENDEZ, S. *et al.* CD8+ T cells are required for primary immunity in C57 BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol.* 2002; 168 (8): 3992-4000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 edição. Atualizada. Brasília, 2017, 180p

CALVOPINA, M. *et al.* Atypical clinical variants in New World cutaneous leishmaniasis: disseminated, erysipeloid, and recidiva cutis due to *Leishmania (V.) panamensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(2):281-4.

CARVALHO, E.M. *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 1994; 56(4):315-25.

CARVALHO, A. M. *et al.* Age Modifies the Immunologic Response and Clinical Presentation of American Tegumentary Leishmaniasis. v. 92, n. 6, p. 1173–1177, 2015.

CASTRO GOMES, C.M.; SOUZA, M.G.T.; MENEZES, J.P.B. *et al.* Immunopathological characterization of human cutaneous leishmaniasis lesions caused by *Leishmania (Viannia) spp.* in Amazonian Brazil. 2017.

CHRUSCIAK-TALHARI, A.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; TALHARI, C. *et al.* Tegumentary leishmaniasis as the cause of immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient co-infected with human immunodeficiency virus and *Leishmania guyanensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 81 (4): 559-64

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F.N.; DA COSTA-SANTOS, M. *et al.* *Leishmania braziliensis* and *in situ* immune response: dispute or partnership? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2010; vol 43(2): 64-71.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F.N.; COUTINHO, S.G. A Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa. *In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. (Ed). Leishmanioses do Continente Americano. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. p. 355-379*

COSTA, J.M.; MARSDEN, P.D.; LLANOS-CUENTAS, E.A. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg.* 1986; 89(6): 319-23.

COTA, G. F.; SOUSA, M. R. DE; FEREGUETTI, T. O. The Cure Rate after Placebo or No Therapy in American Cutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. p. 1–15, 2016.

COUPPIÉ, P. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(5):558-60.

COVAS, C. de J.F. Estudo da influência de polimorfismos nos genes IL-10, IL-12, MIF e TNF na imunopatogênese da leishmaniose tegumentar americana. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ, 2010.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. *ClinMicrobiol Rev.* 2006; 19(1):111-26.

CUNHA, C. F.; FERRAZ, R.; PIMENTEL, M.I.F. *et al.* Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: assessments in active disease, under therapy and after clinical cure. p. 244–254, 2016.

DABOUL, M.W. Role of neutrophils in cutaneous leishmaniasis. *East Mediterr Health J.* 2010;16:1055–58.

DA-CRUZ, A. M. *et al.* Leishmania-Reactive CD4 + and CD8 + T Cells Associated with Cure of Human Cutaneous Leishmaniasis. v. 62, n. 6, p. 2614–2618, 1994.

DANTAS, M.L. *et al.* CD8+ Tcells *in situ* in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013; 46 (6): 728-34.

DANTAS, M.L. *et al.* Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014; 109 (2): 202-9.

DE MELLO, C.X.; FIGUEIREDO, F.B.; MENDES JÚNIOR, A.A. *et al.* *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 95(1):99-103.

ESTERRE, P.; DEDET, J.P.; FRENAY, C. *et al.* Cell populations in the lesions of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study. P. 239-247, 1992.

FARAH, F.S.; KLAUS, S.N.; FRANKENBURG, S. Protozoan and helminth infections. *Dermatology in General Medicine*. 1993

FERRAZ, R.; CUNHA, C.F.; PIMENTEL, M.I.F. *et al.* CD3⁺CD4^{neg}CD8^{neg} (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a⁺ cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasites & Vectors*. 2017;10:219. doi:10.1186/s13071-017-2152-2.

FURTADO, T. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol* 1980;55: 81– 6.

GALVÃO, C.E. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia braziliensis* in the state of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1993;26(2):121-3.

GOMES-SILVA, A.; DA-CRUZ, A.M.; PIRMEZ, C. *et al.* Resposta Imune Celular no Processo de Cura da Leishmaniose Tegumentar Americana. *In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. (Ed). Leishmanioses do Continente Americano*. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. p. 381-388

GREEN, S.J. *et al.* *Leishmania major* mastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*. 1990; 145 (12): 4290-7.

GUIMARÃES, M.C.; CELESTE, B.J.; CAMARGO, M.E. *et al.* Seroepidemiology of cutaneous leishmaniasis from Ribeira do Iguape Valley. IgM and IgG antibodies detected by means of an immunoenzymatic assay (ELISA). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983; 25 (3): 108 – 12.

GUIMARÃES-COSTA, L.H.; MACHADO, P.R.; LAGO, E.L. *et al.* Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(7):712-5.

GUIMARÃES-COSTA, A.B.; NASCIMENTO, M.T.C.; FROMENT, G.S. *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2009 Abr 21; 106(16):6748-6753.

KIMA, P.E.; SOONG, L. (2013) Interferon gamma in leishmaniasis. *Front Immunol* 4:156

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983; 77: 569-96

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In K Killick-Kendrick, *The leishmaniasis in biology and medicine.* Academic Press, London, 1987, p. 1-12.

LINDOSO, J.A.; BARBOSA, R.N.; POSADA-VERGARA, M.P. *et al.* Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol.* 2009;160(2):311-8.

LLANOS-CUENTAS, E.A; ARANA, M.; CUBA, C.A.C. *et al.* Leishmaniasis cutanea diseminada asociada a metastasis en mucosas, causada por *Leishmanibraziliensisbraziliensis*: fracaso en el hallazgo de parasitos circulantes. *RevSocBrasMed Trop.* 1985; 18: 271-2.

MACHADO P.R. *et al.* Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: *in situ* and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105 (8): 438 – 44.

MANZUR, A.; BARI, A. Sensitivity of leishmanin skin test in patients of acute cutaneous leishmaniasis. *Dermatol Online J.* 2006; 12 (4): 2.

CASTRO GOMES, C.M.; SOUZA, M.G.T.; MENEZES, J.P.B. *et al.* Immunopathological characterization of human cutaneous leishmaniasis lesions

caused by *Leishmania* (*Viannia*) spp . in Amazonian Brazil. 2017.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publ.* 1994;10 (supl. 2): 359 – 375.

MASPI, N; ABDOLI, A. & GHAFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis : a review. v. 7724, n. October, 2016.

MENDES, D.S.; DANTAS, M.L.; GOMES, J.M. *et al.* Inflammation in disseminated lesions: an analysis of CD4, CD20⁺, CD68⁺, CD31⁺ and vW⁺ cells in non-ulcerated lesions of disseminated leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013; 108 (1): 18-22.

MENDONÇA, S.C. *et al.* Human American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. *Clin Exp Immunol.* 1986; 64 (2): 269 – 76.

MOREIRA, J.S. Tese. Estudo da Laringite Leishmaniótica. Departamento de Cirurgia. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1994, 118 p.

MORGADO, F.N.; SCHUBACH, A.; ROSALINO, C.M.V. *et al.* Is the *in situ* inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *Br J Dermat.* 2008; 158(1): 50–8.

MORGADO, F.N.; SCHUBACH, A.; VASCONCELLOS, E. *et al.* Signs Of An Inflammatory Reaction In Scars Of Human American Tegumentary Leishmaniasis. *Parasite Immunology (Print).* 2010;32: 285-295.

MORGADO, F. N.; NASCIMENTO, M.T.C.; SARAIVA, E.M. *et al.* Are Neutrophil Extracellular Traps Playing a Role in the Parasite Control in Active American Tegumentary Leishmaniasis Lesions? *PLoS One.* 10, e0133063 (2015)

MOTTA, A.C.; ARRUDA, D.; SOUZA, C.S. *et al.* Disseminated mucocutaneous leishmaniasis resulting from chronic use of corticosteroid. *Int J Dermatol.* 2003;42(9):703-6.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M.J. Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites. *EssaysBiochem.* 2011; 51: 81-95.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunolog.* 2006; 173-182.

NOVAIS, F.O.; SANTIAGO, R.C.; BÁFICA, A. *et al.* Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance against *Leishmania braziliensis* Infection. *The Journal of Immunology.* 2009 December 15;183(12): 8088-8098

OLIVEIRA, L.F.; SCHUBACH, A.O; MARTINS, M.M. *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* 2011;118:87-96.

OLIVEIRA, M.P.; LIMA, M.C.R.; CALHEIROS, A.S. *et al.* *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: human mast cell line activation induced by logarithmic and stationary promastigote derived-lysates. v. 109, p. 72–79, 2005 G

OLIVEIRA-NETO, M.P.; SCHUBACH, A.O.; MATTOS, M. *et al.* Treatment of American cutaneous leishmaniasis: a comparison between low dosage (5 mg/kg/day) and high dosage (20 mg/kg/day) antimony regimens. *Pathol Biol (Paris).* 1997;45:496-9.

PALMEIRO, M.R.; MORGADO, F.N.; VALETE-ROSALINO, C.M. *et al.* Comparative study of the *in situ* immune response in oral and nasal mucosal leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 2012, 34, 23-31.

PAUL, C.; WOLFF, S.; ZAPF, T. *et al.* Mast cells have no impact on cutaneous leishmaniasis severity and related Th2 differentiation in resistant and susceptible mice. *Eur J Immunol* (2016) 46:114–21.10.1002/eji.201545613

PESSÔA, S.B, BARRETTO, M.P. *Leishmaniose Tegumentar Americana.* Ministério da Educação e Saúde, Serviço de Documentação, Rio de Janeiro, 527 pp.

PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K. *et al.* Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest.* 1993; 91 (4): 1390-5.

QUEIROZ, A.; SOUZA, R.; HEINE, C. *et al.* Association between an Emerging Disseminated form of Leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* Strain Polymorphisms. v. 50, n.12, p. 4028-4034, 2012.

QUINTELLA, L.P.; CUZZI, T.; MADEIRA, M.F. *et al.* Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. *Revista Inst. Med. Trop. São Paulo.* 2009; 51 (2): 83-6.

REED, S. G.; SCOTT, P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Current Opinion in immunology* 1993, 5 : 524-531.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol res.* 1998; 31 (1): 143-8.

RODRIGUES, A.M.; HUEB, M.; SANTOS TARR & FONTES, C.J.F. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimonialato de meglumina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39 (2): 139 – 145.

RODRIGUES, F. M. D.; COELHO NETO, G.T.; MENEZES, J.G. *et al.* Expression of Foxp3 , TGF- β and IL-10 in American cutaneous leishmaniasis lesions. *Arch Dermatol Res.* 2013.

ROMERO, G.A.; GUERRA, M.V.; PAES, M.G. *et al.* Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumineantimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:456– 65.

ROSALES-CHILAM, M.; GONGORA, R.E.; VALDERRAMA, L. *et al.* Parasitological confirmation and analysis of *Leishmania* diversity in asymptomatic and subclinical

infection following resolution of Cutaneous Leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 9(12): e0004273 (2015).

SADEGHIAN, G.; IRAJI, F.; NILFROUSHZADEH, M.A. Disseminated cutaneous leishmaniasis on lymphedema following radiotherapy. Int J Dermatol. 2005;44(7):610-1.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing Il-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J.Immunol.1995; 155: 1151-1164.

SCHRANER, C.; HASSE, B.; HASSE, U. *et al.* Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. Clin Infect Dis. 2005; 40(12):e120-4.

SARAVIA, N.G.; WEIGLE K SEGURA, I.; GIANNINI, S.H. *et al.* Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection - reactivation or reinfection? Lancet. 1990; 336: 398-402.

SCHRIEFER, A.; GUIMARÃES, L.H; MACHADO, P.R.L. *et al.* Geographic Clustering of Leishmaniasis in Northeastern Brazil. Emerging Infection Diseases, 15(6): 871-876, 2009.

SCHUBACH, A.; MARZOCHI, M.C.; CUZZI-MAYA, T. *et al.* Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. Am J Trop Med Hyg. 1998; 58: 824-7.

SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K.B.; MOREIRA, J.S. *et al.* Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38(3): 213-217, 2005.

SCHUBACH, A.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. Estado da arte no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES,

C.R. (Ed). *Leishmanioses do Continente Americano*. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. p. 391-412.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. v. 99, n. May, p. 239–251, 2004.

SOTO, J. & SOTO, P. Estado actual y futuro de la terapia anti-leishmaniásica en Colombia. *Biomédica*. 2006; 26 (suppl 1): 194 – 206.

SOUZA, M.A.; CASTRO, M.C.; OLIVEIRA, A.P. *et al.* American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy. *Scand J Immunol*. 2012; 76 (2): 175 – 80.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.

TURETZ, M.; MACHADO, P.R.; KO, A.I. *et al.* Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *The Journal of infectious diseases*, v. 186, n. 12, p. 1829–34, 2002.

VASCONCELLOS, E.C.F.; SCHUBACH, A.O.; VALETE-ROSALINO, C.M. *et al.* American tegumentary leishmaniasis in older adults: 44 cases treated with an intermittent low-dose antimonial Schedule in Rio de Janeiro, Brazil. *J Am Geriatr Soc*. 2010; 58: 614 – 616.

VERNAL, S.; DE PAULA, N.A.; GOMES, C.M. *et al.* Disseminated Leishmaniasis by *Leishmania viannia* Subgenus : A Series of 18 Cases in Southeastern Brazil. n. June 1987, p. 1–5, 2015.

VIEIRA, M.G.S.; OLIVEIRA, F.; ARRUDA, S. *et al.* B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(7):979-83.

VIEIRA-GONÇALVES, R.; PIRMEZ, C.; JORGE, M. *et al.* Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int J Dermat*. 2008;47(9):926-32.

VINCENDEAU, P.; GOBERT, A.P.; DAULOUEDE, S. *et al.* Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol.* 2003;19(1):9–12. doi: 10.1016/S1471-4922(02)00010-7.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Report Series 949. Control of the leishmaniasis. Geneva, 2010, 186 p. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf Acesso em 15/05/17.

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido¹

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – FIOCRUZ

COORDENADOR DA PESQUISA: ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH

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

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

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

NOME DO VOLUNTÁRIO: _____

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

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

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas como: de que outras maneiras a LTA pode se manifestar? como se comportam os exames de laboratório antes, durante e após o tratamento? quais pacientes, mesmo após o tratamento, irão reabrir suas cicatrizes ou irão desenvolver doença dentro do nariz ou na garganta?

¹ 1ª via: Prontuário Médico

2ª via: Paciente

Versão aprovada pelo CEP/IPEC em 28nov08 e mantida inalterada na Emenda aprovada em 2010

Que outras doenças parecidas estão sendo confundidas com a LTA e quais exames devem ser utilizados para esclarecimento? Qual o papel dos seres humanos como reservatórios da doença? quais as melhores formas de tratamento? Que medidas devem ser tomadas para controlar o problema?

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

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

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

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

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

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

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

Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, procure o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz, mesmo fora do seu agendamento. Em caso de necessidade ligue para a Dra Cláudia Maria Valete Rosalino, Dra. Maria Inês Pimentel, 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 de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz.

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

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

Procedimentos, exames e testes que serão utilizados:

Antes do tratamento haverá coleta de informações sobre a doença; exame médico geral e exame da pele com descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões; exame interno do nariz e da garganta com um aparelho chamado fibra ótica, que permite ver lesões pequenas ou em locais de difícil acesso, para descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões (se necessário será aplicado "spray" anestésico local). Retirada, com anestesia local, de um pequeno fragmento de "íngua", de pele ou de mucosa (lesadas ou aparentemente saudáveis) 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 IPEC.

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

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

Formas de ressarcimento:

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

Benefícios esperados:

Espera-se que, ao final do tratamento, você esteja curado da LTA, embora as consultas de retorno por vários anos após o tratamento sejam necessárias para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão ou não beneficiá-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas, pois espera-se

também que este estudo contribua para que o diagnóstico e acompanhamento do tratamento de pacientes com LTA possa ser feito de forma mais eficaz e segura.

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

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

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

Nome paciente: Data

Nome médico: Data

Nome testemunha²: Data

Nome testemunha²: Data

² Apenas no caso de pacientes impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito. No caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.



ANEXO II

Formulário de Coleta de Dados

1.0 INICIAIS:	2.0 DATA DE NASCIMENTO:	3.0 SEXO: () 1. MASCULINO 2. FEMININO
4.0 MUNICÍPIO: () 1. RJ 2. DUQUE DE CAXIAS 3. SEROPEDICA 4. ITAGUAÍ 5. NITERÓI 6. NOVA IGUAÇÚ 7. OUTROS		5.0 1º ATENDIMENTO:
6.0 TEMPO DE EVOLUÇÃO EM MESES: ()	7.0 DOENÇAS ASSOCIADAS: () () () 1. HAS 2. DM 3. CARDIOPATIA/DISLIPIDEMIA 4. HIV 5. ALERGIA 6. HEPATOPATIAS 7. NEFROPATIAS 8. OUTRAS	
8.0 SINTOMAS: () () () 1. FEBRE 2. ASTENIA 3. MIALGIA 4. LINFADENOMEGALIA 5. EMAGRECIMENTO 6. OUTROS	9.0 MEDICAMENTOS: () () () 1. TÓPICO- ANTIBIÓTICO/CORTICÓIDE/ASSOCIAÇÕES 2. ANTIHIPERTENSIVO/HIPOGLICEMIANTE/HIPOCOLESTEROLÊMICO 3-IMUNOSSUPRESSOR 4- ANTIBIÓTICO ORAL 5- OUTROS	
10.0 NÚMERO DE LESÕES ()	11.0 MAIOR DIÂMETRO EM MM ()	12.0 LOCALIZAÇÃO () () () () () () () 1. CABEÇA 2. PESCOÇO 3. TRONCO ANTERIOR 4. TRONCO POSTERIOR 5. MS 6. MI (COXA) 7. PÉ/PERNA
13.0 CULTURA () 1.POSITIVO 2.NEGATIVO 3. NÃO REALIZADO	14.0 HISTOPATOLÓGICO () () () 1. AMASTIGOTA 2. PIG 3. PIC 4. FIBROSE 5. OUTROS	
15.0 IMPRINT () 1. POSITIVO 2. NEGATIVO 3. NÃO REALIZADO	16.0 RIFI () 1. POSITIVO 2. NEGATIVO 3. NÃO REALIZADO	
17.0 ELISA () 1. POSITIVO 2. NEGATIVO 3. NÃO REALIZADO	18.0 PCR () 1. POSITIVO 2. NEGATIVO 3. NÃO REALIZADO	
19.0 PCR () 1. POSITIVO 2. NEGATIVO 3. NÃO REALIZADO	20.0 IDRM () 1. POSITIVO 2. NEGATIVO 3. NÃO REALIZADO	21.0 IDRM EM MM ()
22.0 DESCRIÇÃO: () () () () () 1. ÚLCERA 2.PAPULO-TUB 3. ULC-VEG 4. VERR 5. PLC INFILT 6. CICATRIZ 7. EXUL 8. PLC INFIL ULC		
23.0 DESFECHO : 1. TRATAMENTO 2.CURA ESPONTÂNEA	24.0 DATA DO DESFECHO :	
25.0 INÍCIO DE TRATAMENTO: X. NÃO SE APLICA	26.0 TIPO DE TRATAMENTO: () 1. ANTIMONIATO DE MEGLUMINA 2. PENTAMIDINA 3. OUTROS 4. NÃO SE APLICA	
27.0 ÚLTIMO ATENDIMENTO:	28.0 CONDIÇÕES NO ÚLTIMO ATENDIMENTO () 1. CURA 2. RECIDIVA	

ANEXO III

Parecer de aprovação do CEP

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo clínico, laboratorial, imunológico e molecular comparativo entre pacientes com forma cutânea típica e forma cutânea disseminada da leishmaniose tegumentar americana atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, 1989 a 2014

Pesquisador: Maria Inês Fernandes Pimentel

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49604215.1.0000.5262

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

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.339.143

Apresentação do Projeto:

A leishmaniose disseminada (LDi) caracteriza-se por um número elevado (10) de lesões cutâneas, polimórficas, provavelmente devidas à disseminação hemática dos parasitos, atingindo partes distintas do tegumento, podendo ou não se acompanhar de acometimento de mucosas. Pode ser causada por espécies distintas de *Leishmania*. É relativamente infrequente no contexto da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Sua resposta ao tratamento específico é alvo de controvérsia: pode responder bem ao tratamento convencional com antimoniais pentavalentes, entretanto existem casos descritos de resistência medicamentosa. Questões relativas às características imunológicas dos pacientes afetados, quando comparados com os pacientes com a forma típica de LTA, permanecem a ser respondidas, bem como questões relativas aos parasitos. Espera-se esclarecer aspectos epidemiológicos, clínicos, de resposta ao tratamento específico; aspectos imunológicos in situ; e aspectos genotípicos dos isolados parasitários, que possam elucidar o comportamento diferenciado da doença nos pacientes com LDi, quando comparados aos que desenvolvem formas típicas de leishmaniose cutânea.

Objetivo da Pesquisa:

Objetiva-se estudar uma coorte histórica dos pacientes com LDi atendidos no Laboratório de

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.339.143

Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, que constitui um centro de referência para atendimento dos casos de LTA no estado do Rio de Janeiro, entre 1989 e 2014. Os pacientes atendidos no período serão avaliados, e aqueles com diagnóstico de LDi serão comparados com os pacientes que apresentam a forma cutânea típica da doença, quanto a: 1) características sociodemográficas, apresentação clínica, exames complementares para o diagnóstico, resposta ao tratamento específico; 2) estudo imunológico in situ em fragmentos de lesões cutâneas; 3) estudo genotípico de isolados de *Leishmania sp* derivados de fragmentos de lesões cutâneas obtidos através de biópsia, antes do tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados. Segundo a pesquisadora: Riscos: O estudo é retrospectivo. Não haverá interferência do estudo no diagnóstico, acompanhamento durante e após o tratamento dos pacientes selecionados para o estudo. O risco envolvido é o de confidencialidade dos dados, para tanto os coordenadores do projeto se comprometem a manter os dados confidenciais através de documento anexado ao projeto, a ser assinado e anexado a cada prontuário analisado. Benefícios: Não haverá benefícios diretos aos participantes do estudo. O benefício se dará através da ampliação do conhecimento da forma disseminada de leishmaniose, seu comportamento clínico (inclusive diante dos tratamentos padronizados para LTA), suas características imunológicas e características dos parasitos isolados destes pacientes, em comparação com os pacientes que desenvolvem formas típicas da enfermidade. Benefícios: Não haverá benefícios diretos aos participantes do estudo. O benefício se dará através da ampliação do conhecimento da forma disseminada de leishmaniose, seu comportamento clínico (inclusive diante dos tratamentos padronizados para LTA), suas características imunológicas e características dos parasitos isolados destes pacientes, em comparação com os pacientes que desenvolvem formas típicas da enfermidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem redigido, desenhado e de extrema relevância. Pesquisa com baixo risco adicionais para as participantes do estudo, uma vez que os procedimentos invasivos, biópsias e venocumpultura, apesar de apresentarem riscos a essas participantes, serão/foram realizados por indicação médica, dentro da rotina diagnóstica do laboratório Vigilância em Leishmaniose/VIGILEISH (INI/FIOCRUZ), independente da condução do estudo ora proposto. Assim, os riscos para as participantes desse estudo, que consentirem o uso das amostras pertencentes a elas, via assinatura do TCLE do "Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com leishmaniose tegumentar americana no centro de referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica

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

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.339.143

Evandro Chagas – FIOCRUZ”, aprovado pelo CEP/INI sob número CAAE 0016.0.009.000-02, restringe-se à quebra de confidencialidade/intimidade de seus dados clínicos e pessoais a serem acessados via prontuário médico pela equipe do projeto. Nesse sentido, os pesquisadores responsáveis comprometeram-se a “assinar um termo de confidencialidade a ser incluído no prontuário dos pacientes estudados”. O estudo trará benefícios indiretos às participantes do estudo com a incorporação de conhecimento na literatura biomédica, a ser tornado público, sobre a forma disseminada de leishmaniose, seu comportamento clínico (inclusive diante dos tratamentos padronizados para LTA), suas características imunológicas e características dos parasitos isolados destes pacientes, em comparação com os pacientes que desenvolvem formas típicas da enfermidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado termo de consentimento livre e esclarecido do “Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com leishmaniose tegumentar americana no centro de referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FIOCRUZ”, aprovado pelo CEP/INI sob número CAAE 0016.0.009.000-02, que previa, entre outros, a realização de fotografias e filmagem de lesões para documentação dos casos, coletas de sangue para exames diagnósticos e imunológicos, e coleta de fragmentos de lesões cutâneas para exames diagnósticos e imunológicos. Entretanto, não foi submetido na PB o termo de anuência institucional da direção do centro para a constituição do biorrepositório para armazenamento de fragmentos utilizados nesses exames diagnósticos, onde a mesma assume a responsabilidade do guarda do material biológico.

O parecer original dizia respeito aos seguintes documentos postados na PB:

DispensaTCLE.pdf;

PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_592330.pdf;

FolhaRostoAssinada.pdf;

ProjetoLCdisseminada16set15.doc; e,

TermoCompromissoResponsabilidade.pdf.

Em resposta à pendência imposta no parecer do colegiado, a seguir: “1 – Por a atual pesquisa presumir o uso de Biorrepositório para armazenamento de material biológico humano, faz-se necessário, segundo a Res. CNS 441/11, item 2.III e IV, que a pesquisadora responsável apresente a esse comitê: (2a) “declaração de que toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e,

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.339.143

quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)"; (b) "regulamento aprovado pela instituição depositária destinado à constituição e ao funcionamento do banco de material biológico humano". Na impossibilidade de obtenção do segundo junto à direção do centro onde será constituído o Biorrepositório, a mesma deverá então incluir na resubmissão do estudo para avaliação ética por esse comitê um termo de anuência institucional da constituição desse biorepositório, ou similar, onde a instituição assume a responsabilidade do guarda do material biológico; de acordo com a Res. CNS 441/11, item 9.", foram incluídos na resubmissão do projeto os seguintes documentos:

PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_592330.pdf;

Declaracao_NovaPesquisa.jpg;

EmendaEquipe.jpg; e,

TermoBiorrepositorio.jpg,

atendendo, assim, na íntegra a Res. CNS 441/11.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Indicaremos a aprovação do estudo com a previsão de produção de relatórios semestrais (parciais ou final), de acordo com a Res. CNS no. 466/12 após aprovação do mesmo pela colegiado.

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_BÁSICAS_DO_PROJETO_592330.pdf	04/11/2015 15:48:02		Aceito
Outros	Declaracao_NovaPesquisa.jpg	04/11/2015 15:46:57	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Outros	EmendaEquipe.jpg	04/11/2015 15:46:25	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TermoBiorrepositorio.jpg	04/11/2015 15:45:27	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@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.339.143

Outros	TermoCompromissoResponsabilidade.pdf	23/09/2015 17:25:47	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRostoAssinada.pdf	18/09/2015 19:01:58	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensaTCLE.pdf	16/09/2015 15:04:22	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoLCdisseminada16set15.doc	16/09/2015 14:57:28	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 26 de Novembro de 2015

Assinado por:
Mauro Brandão Carneiro
(Coordenador)

Dr. Mauro Brandão Carneiro
Vice-Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC/FIOCRUZ
Mat. Shape: 463.499-3

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

ANEXO IV

TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, **FÁTIMA CONCEIÇÃO-SILVA**, coordenadora e **ROSSINA PEREIRA E PEREIRA**, aluna do projeto de pesquisa intitulado “**ESTUDO COMPARATIVO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DA DA RESPOSTA IMUNE *IN SITU* ENTRE PACIENTES COM FORMA CUTÂNEA LOCALIZADA E FORMA CUTÂNEA DISSEMINADA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATENDIDOS NO LABORATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA E VIGILÂNCIA EM LEISHMANIOSE, 1989 A 2014**”, comprometo 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 minha responsabilidade.

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, _____ / _____ / _____

Fátima Conceição Silva

Rossina Pereira e Pereira