

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

Fundação Oswaldo Cruz

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

JÉSSICA LEITE DA SILVA

**PARÂMETROS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E DE IMUNIDADE  
CELULAR *IN SITU* EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA  
ATIVA APRESENTANDO REGRESSÃO ESPONTÂNEA PRECOCE,  
BOA OU MÁ RESPOSTA AO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA  
ATENDIDOS NO INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA  
EVANDRO CHAGAS, FIOCRUZ**

RIO DE JANEIRO

2018

DISSERTAÇÃO MPCDI - INI/ FIOCRUZ J.L. SILVA 2018

JÉSSICA LEITE DA SILVA

**PARÂMETROS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E DE IMUNIDADE CELULAR *IN SITU* EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA ATIVA APRESENTANDO REGRESSÃO ESPONTÂNEA PRECOCE, BOA OU MÁ RESPOSTA AO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ATENDIDOS NO INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS, FIOCRUZ**

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

Orientadora: Prof. Dra. Fátima Conceição Silva

Rio de Janeiro

2018

Silva, Jéssica Leite da.

Parâmetros clínicos, laboratoriais e de imunidade celular in situ em pacientes com leishmaniose cutânea ativa apresentando regressão espontânea precoce, boa ou má resposta ao antimoniatto de meglumina atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz / Jéssica Leite da Silva. - Rio de janeiro, 2018.

106 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2018.

Orientadora: Fátima da Conceição Silva.

Bibliografia: f. 64-77

1. Leishmaniose tegumentar americana. 2. in situ. 3. imunohistoquímica. 4. antimoniatto de meglumina. I. Título.

JÉSSICA LEITE DA SILVA

**PARÂMETROS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E DE IMUNIDADE CELULAR *IN SITU* EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA ATIVA APRESENTANDO REGRESSÃO ESPONTÂNEA PRECOCE, BOA OU MÁ RESPOSTA AO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ATENDIDOS NO INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS, FIOCRUZ**

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

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

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)

Dedico este trabalho à minha mãe,  
por todo seu amor, amizade, compreensão  
e por nunca medir esforços para me ver bem.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me guiar novamente à Fiocruz, me mostrando que tudo é possível quando trabalhamos para isto.

À Dra Fátima pela confiança, ensinamentos de anos, por ajudar no meu crescimento profissional e pessoal, fazendo eu ver o mundo de outra forma, pela sua disponibilidade em me ajudar e por sempre me ouvir nos momentos difíceis dentro e fora do laboratório. Por sua generosidade, paciência e principalmente por toda orientação recebida.

À Dra Fernanda Morgado, por suas valiosas contribuições para o trabalho, ajuda e disponibilidade em qualquer momento, além de me ajudar a crescer profissionalmente em outras situações.

Aos membros da banca por aceitarem participar da defesa desta dissertação, agradeço desde já todas as críticas e sugestões.

A equipe do LapClin VigLeish, em especial médicos, enfermeiros e funcionários/estagiários responsáveis pelo atendimento, acompanhamento e diagnóstico dos pacientes dos casos de LTA.

Ao serviço de anatomia patológica do INI- Fiocruz pelos laudos histopatológicos.

Aos pesquisadores, estagiários e alunos do LIP- IOC pelo apoio recebido.

À Pós-Graduação do INI-Fiocruz, por todo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, em especial a Priscilla Sá, pela amizade e disposição de resolver qualquer tipo de problema sempre com muita boa vontade e carinho.

Aos professores maravilhosos do INI, com grandes conhecimentos e paciência ao repassá-los aos alunos.

A Dra Raquel de Vasconcellos pela ajuda estatística e simpatia de sempre.

A Carla Ribeiro por disponibilizar os dados dos casos de LRE e por toda amizade.

À plataforma de microscopia eletrônica do IOC- Fiocruz e ao Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (IOC-Fiocruz), pelo uso do criostato.

Aos meus pais, por todo amor, pela pessoa que sou, pelas torcidas, preocupações, investimentos e por todas as minhas conquistas na vida. Por serem exemplos de pessoas que não desistem do que querem.

Ao meu sobrinho Pedro Leite, pela graça e por fazer meus dias melhores.

Aos amigos de turma pela cumplicidade, amizade e alegria de todos os dias, deixando as aulas mais leves e gostosas de participar.

Aos amigos de laboratório que fiz antes e durante o Mestrado e sempre levarei com muito carinho: Dra Léa, Dra Marta, Alinne Renzetti, Daniel Costa, João Gustavo, Amanda Seba, Rossina Pereira, Kissila Costa e Elizabeth Guizzi.

Aos amigos que a vida me deu de presente e que sempre compreenderam a minha ausência em prol de algo grandioso: Malu, Rodrigo, Renan, Adi e Luciene.

À equipe de limpeza do prédio, em especial a Kátia e a Carla pelo bom humor matinal de sempre, pelas conversas e por sempre proporcionarem um ambiente agradável.

À Fiocruz, pelo lugar lindo e fantástico de sempre.

Aos pacientes de leishmaniose do INI- Fiocruz, pela gentileza das biópsias cedidas para o estudo.

À Capes, Faperj, CNPQ, PAEF-IOC- Fiotec pelo auxílio financeiro.

À todos, muito obrigada!

“E de repente, num dia qualquer, acordamos e percebemos que já podemos lidar com aquilo que julgávamos maior que nós mesmos. Não foram os abismos que diminuíram, mas nós que crescemos.”

*Fabíola Simões*

LEITE-SILVA, J. **Parâmetros clínicos, laboratoriais e de imunidade celular *in situ* em pacientes com leishmaniose cutânea ativa apresentando regressão espontânea precoce, boa ou má resposta ao antimoniato de meglumina atendidos no Instituto Nacional De Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz.** Rio de Janeiro, 2018. 106 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é endêmica no Brasil, sendo causada por espécies do gênero *Leishmania*, sendo a *L. braziliensis* (Lb) responsável pela quase totalidade dos casos no Rio de Janeiro. A LTA apresenta diversas formas clínicas, sendo a forma cutânea localizada (LCL) a mais comum. Apresenta evolução desde casos de resolução espontânea até quadros de má resposta ao tratamento. A literatura aponta que estas diferenças dependem da espécie do parasito e de fatores do hospedeiro, e que a resposta imune, principalmente no sítio das lesões, parece exercer importante influência na evolução da infecção. É sugerido que o tipo e a intensidade da resposta imune estão envolvidos na resposta terapêutica, mas o mecanismo de ação ainda é obscuro. Sendo assim, nos propusemos a avaliar a resposta imune *in situ* em lesões ativas de pacientes que apresentaram regressão espontânea precoce de LCL (LRE), assim como boa (LBR) ou má resposta (LMR) ao tratamento específico, correlacionando este achado com parâmetros clínicos e laboratoriais com vistas à detecção de possíveis padrões relacionados. Para isto avaliamos características clínicas, sócio demográficas, de exames laboratoriais por ocasião do diagnóstico, e comparamos a resposta imune *in situ* das lesões por imunohistoquímica (IHQ) para identificação de células ou marcadores funcionais [(anti-CD4, -CD8, -CD22, -elastase neutrofílica, -mastócito, -CD56, -CD25, -Ki67 e -CD68 (Dako), -iNOS (BD Transduction), -IFN- $\gamma$ , -FoxP3 (BD Biosciences Pharmingen), -ST2L (mdbioscience)], em três grupos de pacientes: (1) LRE; (2) LBR; e (3) LMR ao tratamento inicial específico (em dois momentos: lesão inicial – LMR1 e recidiva-LMR2). De um modo geral, clinicamente os grupos foram considerados semelhantes, havendo diferença apenas no número de lesões e no número de resultados de exames parasitológicos positivos, significativamente maior para os pacientes LMR. Os dados sugerem que os casos avaliados de LRE apresentavam uma resposta imune mais eficiente e melhor modulada devido a maior expressão de IFN- $\gamma$  e NOS2, assim como menor proliferação e menores quantidades de macrófagos, neutrófilos, células NK, ST2L, CD22 e CD8, quando comparadas aos casos de LBR e LMR. Quando comparadas a LBR, as lesões LMR apresentavam menor quantidade de células CD4<sup>+</sup>. Na comparação de LMR2 com LMR1, não foram verificadas diferenças nos perfis celulares e marcadores funcionais, com exceção da quantidade de células ST2L, e uma tendência à diminuição de células CD8<sup>+</sup>. É importante notar que LMR1 apresentava ainda maiores quantidades de macrófagos, Ki67 e menor concentração de IFN- $\gamma$  que LBR, sugerindo a manutenção do estímulo e da resposta inflamatória e o desvio da resposta imune para um perfil menos eficiente no controle da carga parasitária, o que poderia explicar a má resposta ao tratamento.

**palavras chave:** Leishmaniose tegumentar americana, tratamento, cura, resposta imune, imunohistoquímica, *in situ*

LEITE-SILVA, J. **Clinical, laboratorial and cellular immunity parameters among patients with active cutaneous leishmaniasis presenting early spontaneous regression, or good or bad response to meglumine antimoniate followed at the National Institute of Infectious Diseases, Fiocruz.** Rio de Janeiro, 2018. 106 f. Dissertation [Master's in Clinical Research in Infectious Diseases] - National Institute of Infectology Evandro Chagas.

#### ABSTRACT

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is endemic in Brazil, being caused by species of the genus *Leishmania* and *L. braziliensis* (Lb) is responsible for almost all cases in Rio de Janeiro. ATL presents several clinical forms, with localized cutaneous form (LCL) being the most common. Their evolution varies from cases of spontaneous resolution to poor response to treatment. The literature indicates that these differences depend either on the species of the parasite and host factors, and that the immune response, especially at the lesion site, seems to exert an important influence on the evolution of the infection. It is suggested that the type and the intensity of the immune response are both involved in the therapeutic response, but their mechanism of action is still obscure. Thus, we set out to evaluate the *in situ* immune response in active lesions of patients who presented early spontaneous LCL regression (ESR), as well as good (GRL) or poor response (PRL) to the specific treatment, correlating this finding with clinical and laboratory parameters in order to detect possible related patterns. Thus, we evaluated clinical, socio-demographic, and laboratory characteristics at the time of diagnosis, and compared the results of *in situ* immunohistochemistry (IHC) for the identification of cells functional markers [anti CD4, -CD8, -CD22, neutrophilic elastase, -mastocyte, -CD56, -CD25, -Ki67 and -CD68 (Dako), -iNOS (BD Transduction), IFN- $\gamma$ , -FoxP3 (BD Biosciences Pharmingen), ST2L (mdbioscience)] in three groups of patients: (1) ESR; (2) GRL; and (3) PRL (at two occasions: initial lesion – PRL1 and relapse-PRL2). Overall, clinically the groups were considered similar, with differences only in the number of lesions and in the number of positive parasitological tests, significantly higher for PRL patients. The data suggest that the ESR cases presented a more efficient and better modulated immune response due to the higher expression of IFN- $\gamma$  and NOS2, as well as lower proliferation and smaller amounts of macrophages, neutrophils, NK cells, ST2L, CD22 and CD8, when compared to cases of GRL and PRL. In the comparison of PRL2 with PRL1, no differences were found in cell profiles and functional markers, except for the amount of ST2L cells, and a tendency to decreased CD8<sup>+</sup> cells. When compared to GRL, PRL lesions had a lower amount of CD4<sup>+</sup> cells. It is important to note that PRL1 presented even greater amounts of macrophages, Ki67 and lower IFN- $\gamma$  concentration than GRL, suggesting the maintenance of the stimulus and the inflammatory response and the deviation of the immune response to a less efficient profile in the control of the parasite load. This could explain the poor response to treatment.

**Key words:** American tegumentary leishmaniasis, treatment, cure, immune response, immunohistochemistry, *in situ*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> Número de casos de leishmaniose tegumentar no Brasil, 1980-2013	02
<b>Figura 2</b> Casos de LTA segundo gênero, 2007 a 2015, RJ	03
<b>Figura 3</b> Casos de LTA segundo faixa etária, 2007 a 2015, RJ	03
<b>Figura 4</b> Ciclo biológico do protozoário <i>Leishmania</i> spp	04
<b>Figura 5</b> Inseto vetor <i>Lutzomyia</i> sp	05
<b>Figura 6</b> <i>Leishmania</i> - Forma amastigota	05
<b>Figura 7</b> <i>Leishmania</i> - Forma promastigota	05
<b>Figura 8</b> Lesão de LTA e lesão de esporotricose	07
<b>Figura 9</b> Neutrófilo e seus mecanismos de ação sobre o patógeno	19
<b>Quadro 1-</b> Acompanhamento do tratamento dos casos de LMR e LBR	32
<b>Figura 10</b> Marcações de células CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> e Ki67 pela técnica de imunohistoquímica	34
<b>Figura 11</b> Marcações de neutrófilos e NK pela técnica de imunohistoquímica	35
<b>Quadro 2</b> Análise quantitativa dos tipos celulares e marcadores funcionais presentes no infiltrado inflamatório das lesões de LTA de acordo com os grupos estudados	37
<b>Quadro 3</b> Análise comparativa dos tipos celulares e marcadores funcionais entre os grupos estudados	38
<b>Quadro 4</b> Comparação estatística dos resultados de imunohistoquímica entre os grupos LRE, LBR e LMR-1	39
<b>Quadro 5</b> Comparação estatística dos resultados de imunohistoquímica entre os grupos LMR-2, LMR-1, LBR e LRE	40
<b>Figura 12</b> Distribuição percentual de células CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> nas lesões dos grupos estudados	41
<b>Figura 13</b> Distribuição percentual de células CD22 <sup>+</sup> e macrófagos nas lesões dos grupos estudados	42

<b>Figura 14</b> Distribuição percentual de células NK e mastócitos nas lesões dos grupos estudados	43
<b>Figura 15</b> Distribuição percentual de neutrófilos e Ki67 nas lesões dos grupos estudados	44
<b>Figura 16</b> Distribuição percentual de Foxp3 <sup>+</sup> e CD25 <sup>+</sup> nas lesões dos grupos estudados	45
<b>Figura 17</b> Distribuição percentual da positividade para IFN- $\gamma$ e ST2L nas lesões dos grupos estudados	47
<b>Figura 18</b> Concentração de ST2L no grupo de má resposta ao tratamento durante a lesão primária e recidiva	47
<b>Figura 19</b> Imunohistoquímica em lesões de LTA. Expressão de NOS2	48
<b>Figura 20</b> Imunohistoquímica em lesões de LTA. Presença de parasitas em lesões de LBR	49
<b>Figura 21</b> – Imunohistoquímica em lesões de LTA. Presença de <i>nets</i> em lesões de LBR	50
<b>Quadro 6-</b> Comparação dos resultados de imunohistoquímica entre os grupos estudados	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Dados clínicos dos pacientes de leishmaniose cutânea localizada (LCL) do grupo de má resposta ao tratamento com antimonial pentavalente. INI, Fiocruz entre 2005 a 2015	29
<b>Tabela 2-</b> Positividade dos exames diagnósticos nos diferentes grupos de pacientes com LCL atendidos no INI, Fiocruz entre 2005-2015	30
<b>Tabela 3-</b> Número de exames parasitológicos positivos durante a confirmação de LTA em cada grupo. INI, Fiocruz. 2005-2015	31
<b>Tabela 4-</b> Marcadores, diluições ótimas e funções. Imunoparasitologia, IOC- Fiocruz	33
<b>Tabela 5-</b> Expressão de NOS2 nos diferentes grupos estudados	48
<b>Tabela 6-</b> Contagem de <i>Leishmania</i> e NETs por mm <sup>2</sup>	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	Aminoethyl carbazole (amino etilcarbazol)
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AM	Antimoniato de meglumina
BALB/C	Linhagem de camundongos susceptíveis à maioria das espécies de <i>Leishmania</i> que desenvolvem infecção no modelo murino
CD	Grupo de diferenciação
CEP-INI	Comitê de Ética em Pesquisa no INI-Fiocruz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FoxP3	Do inglês Forkhead box P3
Gp	Glicoproteína
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HE	Hematoxilina eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IL	Interleucina
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina -12
IL-17	Interleucina-17
IL-22	Interleucina-22
INF- $\gamma$	Interferon gama
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
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
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LBR	Grupo de pacientes de LTA com boa resposta ao tratamento

LMR	Grupo de pacientes de LTA com má resposta ao tratamento
LRE	Grupo de pacientes de LTA com resolução espontânea precoce
LV	Leishmaniose Visceral
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MI	Membros Inferiores
MS	Membros Superiores
NK	Célula <i>natural killer</i> (matadoras naturais)
NNN	Meio Novy, MacNeal, Nicolle
NO	Óxido Nítrico
NOS2	Óxido nítrico sintetase do tipo 2
PBS	Phosphate buffered solution (solução salinada fosfatada tamponada)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PV-LTA	Programa de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana
RPL	Resposta proliferativa primária de linfócitos
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
T CD4	Linfócito T CD4
T CD8	Linfócito T CD 8
T reg	Linfócitos T reguladores
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de células T
TGF- $\beta$	Fator de crescimento tumoral beta
Th	Célula T auxiliar
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
Th17	Linfócito T auxiliar 17
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO, RESERVATÓRIO E VETOR.....	04
1.3 A INFECÇÃO.....	06
<b>1.3.1 Formas clínicas da LTA</b> .....	09
1.4 DIAGNÓSTICO.....	10
1.5 O TRATAMENTO DA LTA.....	12
1.6 A RESPOSTA IMUNE NA LTA.....	14
<b>1.6.1 Marcadores celulares e funcionais</b> .....	18
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>4. MÉTODOS</b> .....	24
4.1 CASUÍSTICA.....	24
<b>4.1.1 Delineamento e população do estudo</b> .....	24
<b>4.1.2 Considerações éticas</b> .....	25
<b>4.1.3 Critérios de inclusão e exclusão</b> .....	25
4.2 MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS.....	26
4.2.1 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).....	26
4.3 PLANO DE ANÁLISE.....	27
<b>5. RESULTADOS</b> .....	28
5.1 ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS.....	28
5.2 RESPOSTA IMUNE <i>IN SITU</i> VERIFICADA POR IMUNOHISTOQUÍMICA NAS LESÕES.....	33
<b>5.2.1 Verificação de diluições ótimas e marcação com anticorpos utilizados nos tecidos de lesão de LTA</b> .....	33
<b>5.2.2 Perfis celular e funcional observados no infiltrado inflamatório presente nas lesões de LTA nos grupos avaliados (LRE, LBR, LMR-1 e LMR-2)</b> .....	36
5.2.2.1 CD4, CD8, Neutrófilos, CD22, CD68, CD56, Mastócitos, CD25, ST2L, FOXP3 E IFN- $\gamma$ .....	36
5.2.2.2 NOS, PRESENÇA DE NETs E <i>Leishmania</i> spp.....	48
5.2.2.3 RESUMO DOS RESULTADOS COMPARATIVOS OBTIDOS ENTRE OS 4 GRUPOS DE ESTUDO.....	50
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	62
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64
<b>9. ANEXOS</b> .....	77

# 1 INTRODUÇÃO

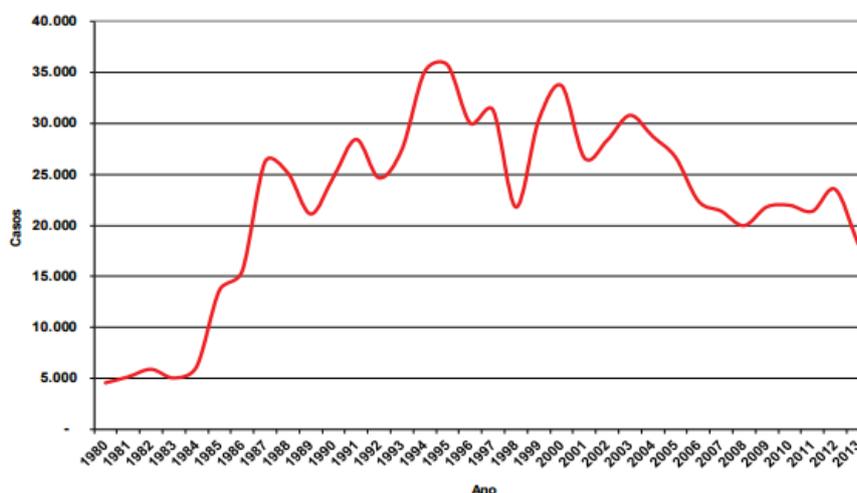
## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas que podem se apresentar clinicamente de forma variada. As duas formas clínicas principais são: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). Distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, podem ser encontradas em 98 países com incidência de aproximadamente 0,7 a 1 milhão de casos de leishmaniose tegumentar por ano, e de 200 a 400 mil casos de LV (ALVAR et al., 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016) principalmente nos locais com maior índice de pobreza, desnutrição e aglomeração populacional. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que há cerca de 900 mil a 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorrendo anualmente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Assim, em seu conjunto as leishmanioses são consideradas uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produção de deformidades e letalidade (nos casos de infecção visceral).

Nas Américas, a LV é causada pela *L. infantum*, e pelo menos 16 diferentes espécies de *Leishmania* foram identificadas como agentes causais da leishmaniose tegumentar americana (LTA) em ambos os subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (SILVEIRA, LAINSON & CORBETT, 2004; CALVOPINA et al., 2005). Para o Ministério da Saúde (2010), no Brasil, as espécies causadoras de LTA mais comuns são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Esta última tem ampla distribuição extra-amazônica, do sul do Pará ao Nordeste, atingindo também o centro sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental. É o agente mais frequentemente encontrado, sendo endêmico no Rio de Janeiro, onde apresenta padrão de transmissão intra e peri-domiciliar (MENESES et al., 2002; SOUZA et al., 2002).

Apesar da LTA ser uma doença negligenciada com altos índices de casos, esse quadro parece sofrer variações com o passar dos anos no Brasil. É o que demonstra a figura 1. O número de acometimentos de 2000 a 2013 apresentou média anual de 24.694 casos registrados e uma detecção média de 13,5 casos por 100 mil habitantes. Ao longo do tempo, observou-se uma tendência de redução da endemia, passando de um coeficiente de detecção de 20,3 casos por 100 mil habitantes em 2000, para 9,1 em 2013 (MINISTÉRIO

DA SAÚDE, 2015). Uma explicação para esta mudança pode estar na implementação de ações de saúde voltadas para o controle da doença e vetor, ou mudanças climáticas e/ou ambientais que dificultem a transmissão.

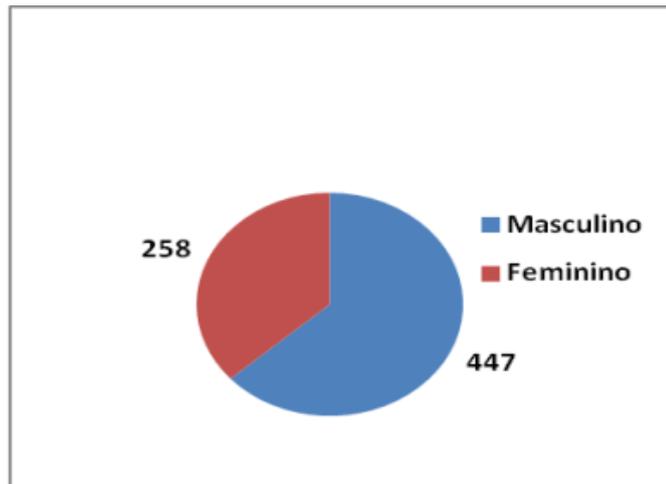


**Figura 1:** Número de casos de leishmaniose tegumentar no Brasil, 1980-2013

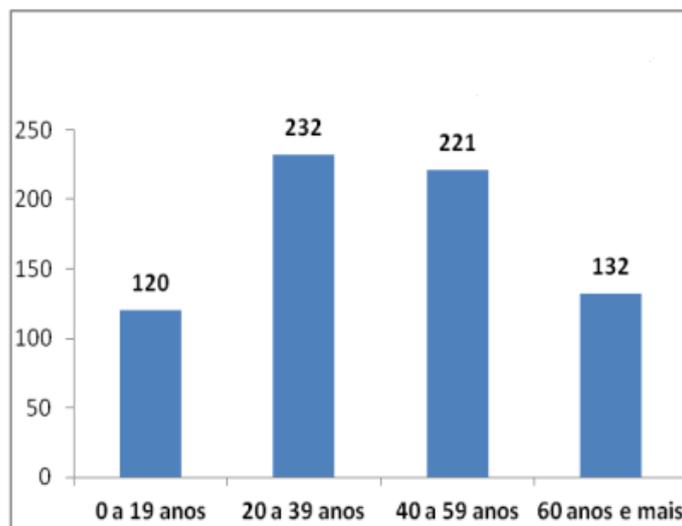
**Fonte:** Ministério da Saúde, 2015

O número de notificações de LTA no RJ entre 2007 e 2015 foi de 705 casos, destes, 609 foram autóctones ou tiveram auctonia indeterminada ou ignorada. De 2013 a 2015 a média de notificações de LTA no RJ, pelo Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) foi de 30 casos por ano. Ao compararmos com a média de 2007 a 2009 (122 casos por ano), notamos uma queda de 4 vezes no número de casos notificados (SES-RJ, Boletim epidemiológico 2016).

A figura 2 demonstra a predominância do sexo masculino em relação aos pacientes acometidos pela LTA no Rio de Janeiro entre os anos de 2007 a 2015, e a figura 3 os dois grupos de faixas etárias mais acometidas, sendo o primeiro entre 20 a 39 anos e o segundo de 40 a 59 anos. Estes dados poderiam ser explicados pela maior exposição laboral em homens adultos, quando ficam expostos a picadas de flebotomíneos.



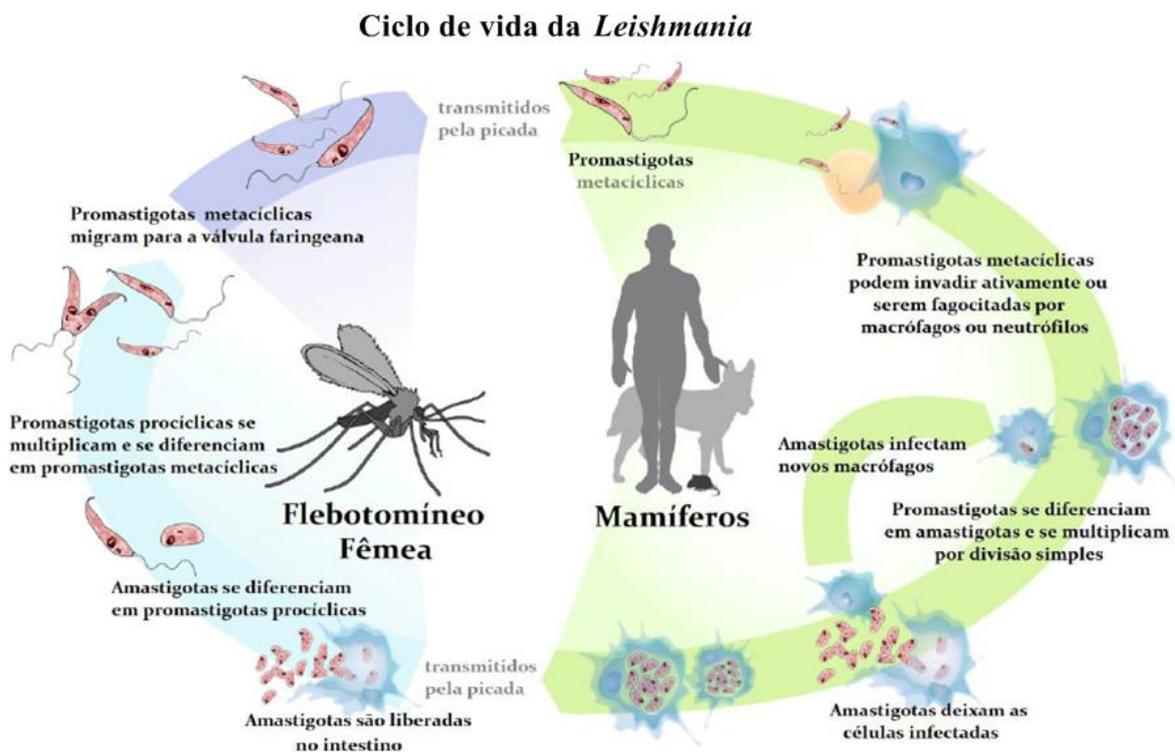
**Figura 2-** Casos de LTA segundo gênero, 2007 a 2015  
**Fonte:** SINAN, GDTVZ, SES/RJ, 2016



**Figura 3-** Casos de LTA segundo faixa etária, 2007 a 2015  
**Fonte:** SINAN, GDTVZ, SES/RJ, 2016

## 1.2 AGENTE ETIOLÓGICO, RESERVATÓRIO E VETOR

As leishmanioses são transmitidas aos hospedeiros vertebrados por fêmeas infectadas da família de insetos *Psychodidae* genericamente denominados flebotomíneos (BASANO; CAMARGO, 2004). Alguns fatores como o desmatamento, migração, aquecimento global, caçadas a animais silvestres, construção de rodovias, dentre muitos outros, contribuem para o aumento populacional destes flebotomíneos e para a dispersão dos parasitos para áreas antes não endêmicas. O ciclo biológico da *Leishmania* (figura 4) se inicia quando a fêmea do flebotomíneo (figura 5) adquire as formas amastigotas do protozoário (figura 6) ao realizar o repasto sanguíneo em reservatórios infectados, que ao chegarem no sistema digestivo do vetor, transformam-se em promastigotas (figura 7). As promastigotas são as formas infectantes que no próximo repasto, serão introduzidas na pele do hospedeiro e irão parasitar células do sistema fagocítico mononuclear (monócitos, histiócitos e macrófagos) da derme e mucosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

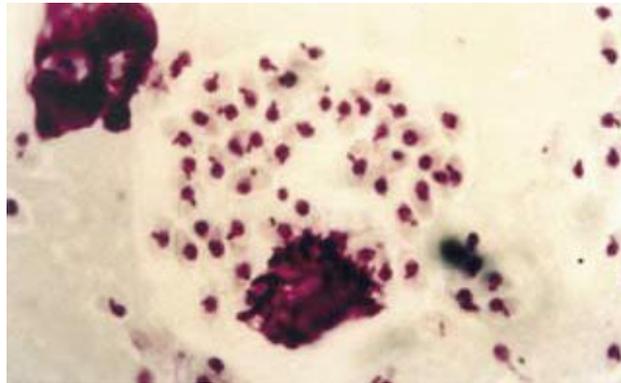


**FIGURA 4-** Ciclo biológico do protozoário *Leishmania* spp no homem e no vetor. **Fonte:** IBICT acessado em 03/2018 pelo link [ww.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295](http://ww.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295)



**Figura 5-** Inseto vetor *Lutzomyia sp.*

**Fonte:** Manual de Vigilância da LTA- Ministério de Saúde, Brasil, 2013



**Figura 6-** *Leishmania spp* - Forma amastigota

**Fonte:** Manual de Vigilância da LTA, Ministério de Saúde, Brasil, 2013



**Figura 7-** *Leishmania spp* – Forma promastigota

**Fonte:** Manual de Vigilância da LTA, Ministério de Saúde, Brasil, 2013

A LTA pode ser considerada um importante problema de saúde pública nas Américas devido à sua dispersão no continente, e, dependendo da espécie infectante e da resposta imune celular do hospedeiro, podem-se desenvolver variadas formas clínicas da doença (SILVEIRA, LAINSON & CORBETT, 2004). Assim, a diversidade de espécies de *Leishmania*, de reservatórios vertebrados e flebótomos vetores em diferentes locais, podem ter influência no desenvolvimento das diversas formas clínicas que a leishmaniose pode apresentar (FARAH; KLAUS; FRANKENBURG, 1993). Além disso, acredita-se que a resposta imunológica do hospedeiro irá definir o processo da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Diversas espécies de mamíferos podem servir como reservatório para a *Leishmania*, como canídeos, marsupiais, roedores, edentados, etc. O homem em áreas endêmicas acaba sendo infectado acidentalmente. A forma visceral também pode ser transmitida por acidentes laboratoriais, transfusões de sangue e transplante de órgãos, apesar de raros os casos (DEY, 2006). Atualmente as estratégias de profilaxia da leishmaniose constituem o controle de reservatórios e vetor, detecção de novos casos, tratamento dos casos já existentes e uso de inseticidas, principalmente em locais de mata e ao entardecer, período de maior atividade dos flebotomíneos.

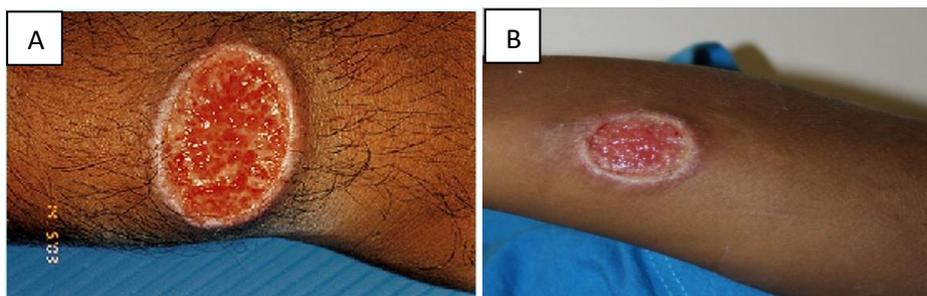
### 1.3 A INFECÇÃO

De forma geral, a infecção tegumentar por *Leishmania (Viannia) braziliensis* manifesta-se como leishmaniose cutânea ou mucocutânea. A infecção produzida por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* produz lesões cutâneas típicas (leishmaniose cutânea) ou difusas (forma cutânea difusa anérgica) (SILVEIRA, LAINSON & CORBETT, 2004; AZEREDO-COUTINHO et al., 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A *Leishmania (Viannia) guyanensis* provoca quadros cutâneos típicos e raramente formas mucosas, por contiguidade ou inoculação direta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Independente da espécie de *Leishmania* identificada, o aspecto clínico mais característico (típico) das lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar é semelhante e denominado leishmaniose cutânea localizada (LCL) (MATTOS, 1993; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; GUERRA et al., 2003; SILVEIRA, LAINSON & CORBETT, 2004)

caracterizada por uma ou poucas úlceras indolores com bordas elevadas, infiltradas, eritemato-violáceas (“bordas em moldura”) e fundo granuloso com pouca secreção (figura 8A).

A lesão típica pode ser diagnosticada com certa facilidade em áreas endêmicas, se não houver superposição com infecções de pele com características clínicas semelhantes como piodermites, úlceras vasculares, traumáticas e esporotricose, entre outras (foto 8B) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007, ANTONIO et al., 2017).



**FIGURA 8-** (A) Lesão de LTA se assemelhando à lesão de esporotricose fixa (B)  
(Imagens cedidas pelo Dr. Marcelo Lyra – LapClin VigiLeish – INI-Fiocruz)

Casos de regressão espontânea precoce podem ser identificados ainda durante o processo de diagnóstico, em pacientes com tempo de evolução pequeno (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2017). A partir desta observação algumas hipóteses podem ser cogitadas. Tal fenômeno poderia ser explicado pelo estabelecimento precoce de uma resposta imune específica eficiente na eliminação do parasito (LOCKSLEY et al., 1987; HEINZEL et al., 1989; AWASTHI et al., 2004;). Outra possibilidade seria a influência de características genéticas do parasito. No entanto, casos de cura espontânea precoce têm sido descritos em praticamente todas as áreas endêmicas, independente da predominância da espécie envolvida.

Quando o diagnóstico é confirmado e o tratamento instituído, normalmente as lesões regridem rapidamente com epitelização e, em período de tempo variável, para a cicatrização total da úlcera. No entanto, em alguns casos os pacientes não respondem bem ao tratamento instituído, seja pela ausência de sinais de cicatrização, seja pela epitelização inicial seguida de reaparecimento de sinais de atividade no local da lesão primária. Quando isto acontece ainda no período de avaliação da resposta terapêutica o grupo do LapClin VigiLeish convencionou denominar insucesso terapêutico. Esta denominação foi dada para distinguir a falha terapêutica, definida pelo Ministério da Saúde como a ausência de

cicatrização ou reativação da lesão após dois ciclos completos de tratamento, enquanto o insucesso terapêutico seria a reativação da lesão após o primeiro ciclo completo.

Nos últimos anos tem surgido cada vez mais frequentemente a possibilidade de casos de resistência ao fármaco de primeira escolha (SANTOS et al., 2002; ROJAS et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006). Contudo, em relação aos fatores que influenciaram a má resposta, a literatura não é conclusiva (OLIVEIRA-NETO et al, 1998; SANTOS et al., 2002; MACHADO et al., 2002; ROJAS et al., 2006; CALVOPINA et al., 2006, RODRIGUES et al, 2006; UNGER et al, 2009). No nosso país, as percentagens de falhas terapêuticas descritas têm grande variação, sendo que no Rio de Janeiro recentemente foi descrito uma taxa de 5,8% (BRAHIM et al., 2017), mas em outras regiões podem chegar a 49% para *L. braziliensis* (MACHADO et al., 2002; ROJAS et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006). Os autores têm relacionado estas ocorrências a fatores tão diferentes quanto peso do paciente, número de lesões, co-infecções, virulência do parasita e cepas de *Leishmania* spp que desenvolveram resistência ao antimonial pentavalente (SANTOS et al., 2002; MACHADO et al., 2002; ROJAS et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006; UNGER et al., 2009). Muitos destes fatores são difíceis de comprovar e, além disto, muitos outros fatores intervenientes podem agir de maneira sinérgica na determinação da resposta ao tratamento. Uma das possibilidades mais estudadas é a existência de parasitas resistentes ao antimônio (AZEREDO-COUTINHO et al, 2007).

Outra possibilidade seria a existência de parasitas com grande capacidade de replicação aumentando assim o processo inflamatório e a carga parasitária e conseqüentemente dificultando sua eliminação. Baptista et al (2009) descreveram a existência de diferentes clones isolados do mesmo paciente em dois momentos: durante a fase inicial e durante o diagnóstico de recidiva das lesões. No entanto, outros casos de falha terapêutica não apresentavam diferença. Mais recentemente Batista et al (2015) sugeriram que a exposição prévia ao tratamento poderia prejudicar a capacidade das promastigotas de se multiplicarem *in vitro*, entretanto relataram não haver diferença na sua capacidade de infectar macrófagos murinos. No entanto, outros autores têm identificado correlação entre características do parasita e o tipo de lesão e a resposta terapêutica. Bilbao-Ramo et al (2017), por exemplo, demonstraram diferenças na susceptibilidade de alguns fármacos em isolados de *L. (V.) braziliensis*, *L. (Viannia) lainsoni* e *L. (Leishmania) mexicana*.

Assim, apesar dos estudos publicados, ainda não foi possível indicar o(s) fator (es) que determina (m) a má resposta ao tratamento. Além disto, dados publicados têm demonstrado que nem sempre é possível a correlação entre estudos *in vitro* de resistência aos medicamentos e a resposta ao tratamento *in vivo*. Atualmente as técnicas de estudo *in situ* têm se tornado ferramentas importantes para o entendimento da resposta imunológica de uma grande variedade de doenças infecciosas, pois permitem a identificação do agente infeccioso além do tipo de células e citocinas envolvidas na resposta inflamatória (AMATO et al., 2003; CONCEIÇÃO-SILVA et al., 2010).

Resumindo, muito pouco ainda se sabe sobre possíveis fatores que pudessem estar envolvidos na evolução das lesões tegumentares para a cura clínica e proteção contra recidivas e reinfecções.

### 1.3.1 Formas clínicas da LTA

Em 1994, M. Marzochi & K. Marzochi realizaram uma classificação de grupos de forma cutânea e mucosa baseada tanto em aspectos clínicos como evolutivos da doença, que foi utilizada, com adaptações, pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017), sendo os principais:

- *Leishmaniose Cutânea Localizada*: O tipo de lesão mais comumente encontrado é a úlcera, com medidas variáveis de alguns milímetros até alguns centímetros, e sendo única em mais da metade dos casos, localizadas geralmente nas áreas expostas (AZEREDO-COUTINHO, 2014).
- *Leishmaniose Cutânea Disseminada*: Apresenta-se de forma contrária a LCL em relação à quantidade de lesões. O paciente apresenta dez ou mais lesões em duas ou mais regiões não contíguas do corpo, podendo chegar a centenas. Corresponde apenas a 2% dos casos e é considerada uma das formas raras da doença (BRASIL, 2017).
- *Leishmaniose Cutânea Difusa*: Esta forma de LTA é considerada grave. É caracterizada por lesões nodulares, não ulceradas e com teste IDRМ negativo, devido a baixa resposta imunológica. Os fármacos utilizados durante o tratamento

não são muito efetivos e os pacientes apresentam geralmente apenas uma melhora transitória. No Brasil, a espécie causadora dos casos da forma cutânea difusa é a *L. amazonensis* (BRASIL, 2017).

- *Leishmaniose Mucosa*: É considerada uma das formas graves na LTA e costuma aparecer anos após a lesão cutânea. Desenvolve-se de forma crônica, levando a obstrução nasal, secreções, dor e deformidades, que podem ser irreversíveis. A lesão inicial geralmente ocorre no nariz, mas pode ocorrer disseminação para as tonsilas, palato e laringe (MOREIRA, 1994). De um modo geral, é causada por espécies do subgênero *Viannia* (DISCH et al., 2005), entretanto casos por espécies do subgênero *Leishmania* já foram relatados no país (BARRAL et al., 1991).
- *Leishmaniose Recidiva Cútis*: Consiste na reativação de lesões, ao redor ou dentro da cicatriz da forma clássica cutânea de leishmaniose (BITTENCOURT et al., 1993), e apesar da dinâmica em que ocorre, este fenômeno ainda permanece um pouco obscuro. Acredita-se na ideia de um defeito na ativação dos linfócitos T e funcionalidade dos macrófagos para eliminar as formas amastigotas (SERAFINELLA, 2000). A IDRMM apresenta-se positiva.

#### 1.4 DIAGNÓSTICO

A LTA possui uma diversidade de formas clínicas e pode se assemelhar a muitas outras doenças, dificultando o diagnóstico e conseqüentemente a avaliação do prognóstico do paciente. A leishmaniose cutânea, por exemplo, pode se apresentar em diferentes formas, tamanhos e números de lesões. Alguns métodos diagnósticos são desejáveis para confirmação, visto que a história epidemiológica e o aspecto clínico nem sempre são satisfatórios para a conclusão de um diagnóstico. Os exames parasitológicos são geralmente de fácil manejo e baixo custo.

O exame direto por escarificação da lesão ou por impressão em lâmina ou fragmentos de lesões, por exemplo, pode evidenciar a presença do parasita, entretanto quanto mais tardia for a lesão menor se torna a probabilidade de encontrá-lo (BRASIL, 2009). A histopatologia e o isolamento do parasita em cultivo têm bom percentual de positividade,

mas sua realização necessita de equipamentos e pessoal treinado. A reação da polimerase em cadeia (PCR) é um método altamente sensível e útil para identificação e discriminação da espécie de *Leishmania* (AKHOUNDI et al., 2016), o que pode facilitar o manejo de cada paciente individualmente.

A intradermoreação de Montenegro (IDRM) e sorologias específicas como ELISA e imunofluorescência indireta também são importantes ferramentas. Notadamente, a IDRM é um exame de 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. Deve ser analisada após 48h-72h da injeção medindo a área de induração da lesão formada, considerando-se positivo um diâmetro maior ou igual a 5mm. Alguns autores verificaram que a positividade da IDRM independe da duração das lesões, do gênero ou da idade dos pacientes (MANZUR & BARI, 2006). Mas a resposta a IDRM deve ser interpretada com cautela pois outros sugerem que lesões muito recentes podem apresentar IDRM negativas, já que durante as quatro a seis primeiras semanas da lesão o teste pode se apresentar negativo (BRASIL, 2017) e que o teste pode se manter positivo após o tratamento e cicatrização. É verificado que habitantes de áreas endêmicas também podem apresentar teste de IDRM positivo (BORGES et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2005). Além disto, já foram relatados casos de IDRM positiva em pacientes com esporotricose confirmada no Rio de Janeiro (DE LIMA BARROS et al., 2005).

Os testes sorológicos também não devem ser utilizados como critério exclusivo, pois sua especificidade e sensibilidade dependem de diferentes fatores como o tipo de ensaio, fatores do próprio hospedeiro, antígenos utilizados, dentre outros (ARONSON, 2016). Assim, o ideal seria que estes testes se complementassem para um diagnóstico mais robusto e confiável.

## 1.5 O TRATAMENTO DA LTA

O Programa de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (PV-LTA) é responsável pela detecção precoce de casos, investigação e monitoramento de efeitos adversos dos medicamentos, por exemplo (BRASIL, 2017). Os medicamentos recomendados para o tratamento de LTA cutânea têm elevada toxicidade sistêmica, ocasionalmente levando a fatalidades (LIMA et al., 2007).

### *Antimoniato de Meglumina*

Os antimoniais pentavalentes constituem as drogas de primeira linha para o tratamento das leishmanioses com sensibilidades variadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (AZEREDO-COUTINHO et al., 2014). Diferentes regimes terapêuticos têm sido sugeridos com algumas diferenças primordiais: uso de antimoniato de meglumina ou de estibogluconato de sódio, via de administração, administração contínua ou intermitente do medicamento, dose diária, duração do tratamento, critérios utilizados para interromper ou para prolongar o tratamento e as espécies e cepas de *Leishmania* envolvidas. A OMS padronizou a terapia com o fármaco e atualmente é recomendado que a dose do antimonial seja calculada em mg Sb<sup>+5</sup>/kg/dia.

O antimoniato de N-metilglucamina pode ser usado em mulheres acometidas pela leishmaniose tegumentar em período de amamentação dada a baixa dosagem encontrada no leite materno, entretanto ele não é indicado para gestantes devido ao risco do desenvolvimento de síndromes fetais (BRASIL, 2017). Os efeitos colaterais mais frequentes costumam ser artralgia, mialgia, anorexia, cefaleia, febre, vômitos, tonturas, insuficiência renal, entre outros (SALDANHA et al, 2000). O principal efeito adverso do Sb<sup>+5</sup> é decorrente da sua ação sobre o aparelho cardiovascular, por isso é importante a realização de exames cardiovasculares repetidos até o fim do tratamento a fim de evitar maiores complicações. Pacientes com idade superior a 50 anos, cardiopatas e afins devem receber medicação com cautela (MELGARES, 2012). Nos casos de contra-indicação ao antimonial pentavalente, outros fármacos como a anfotericina B e a pentamidina podem ser utilizados (AMEEN, 2010).

A aplicação é realizada por via intramuscular, endovenosa ou mesmo via intralesional, sendo esta última utilizada geralmente em pacientes que apresentam de uma a duas lesões cutâneas (SCHUBACH et al., 2014).

#### *Anfotericina B e Pentamidina*

São comumente as drogas de segunda linha quando há contra-indicação ao antimoniato, porém em alguns países podem ser consideradas como primeira opção, até mesmo pela espécie predominante no local. Na Guiana Francesa, por exemplo, a maioria dos casos relatados são causados por *L. guyanensis* e a pentamidina é a droga de primeira escolha (BLUM, 2004). Pimentel et al (2011) relataram um caso de resistência ao antimonial pentavalente, intolerância à anfotericina B lipossomal e ao desoxicolato de anfotericina B, onde após diversas tentativas terapêuticas, a pentamidina foi administrada e as lesões cicatrizaram após 2,4 g da dose utilizada em 23 dias de tratamento. Assim como o antimoniato de meglumina, também possuem alguns efeitos adversos comuns como dor, náuseas, vômitos, mialgias, dentre outros.

#### *Miltefosina*

O uso deste medicamento ainda é discutido. Em 2002 foi registrado para uso da forma visceral na Índia e após alguns anos, na Colômbia (BERMAN, 2008). Seu uso pode ocasionar elevação das aminotransferases e da creatina fosfoquinase (SCHUBACH et al., 2014; BERMAN, 2008). Resultados discrepantes quanto a sua eficácia têm questionado seu uso em larga escala (REVEIZ et al., 2013).

#### *Outras terapias*

Existem alguns tratamentos alternativos feitos com extremos de temperatura sobre a lesão como a crioterapia, que consiste na aplicação de nitrogênio líquido (-195 ° C) (LAYEGH, 2009) e a termoterapia a 50 ° C. Outras drogas e fitoterápicos tem sido testados, mas ainda não estão disponíveis para uso em larga escala (OLIVEIRA et al., 2014; BEZERRA et al., 2006)

A detecção precoce da infecção é crucial para dar início a um tratamento adequado, evitando assim danos maiores ao paciente. Grupos científicos estudam a combinação de componentes para o desenvolvimento de uma vacina para a leishmaniose cutânea, visando

a prevenção da doença, mas esse quadro ainda é bastante complexo já que envolve diversos fatores como características genéticas do vetor e do parasita, virulência e características epidemiológicas distintas, resposta imunológica bem definida, dentre outros pontos que ainda não estão totalmente esclarecidos (DE LUCA, 2016). O melhor conhecimento da resposta imune e dos fatores que influenciam a evolução da infecção, poderiam auxiliar no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento assim como no desenho de novos compostos e estratégias vacinais.

## 1.6 A RESPOSTA IMUNE NA LTA

Algumas técnicas como a imunohistoquímica e a hibridização *in situ* têm se tornado métodos interessantes para a obtenção de dados que proporcionem uma melhor compreensão da imunopatogenia de uma diversidade de doenças infecciosas que produzem lesões teciduais, incluindo a leishmaniose (MORGADO et al., 2008). A partir destas técnicas, as dinâmicas do processo inflamatório da pele puderam ser conhecidas e detalhadas mais a fundo (KOCH et al., 2006; MORGADO et al., 2008).

A pele é o maior órgão do corpo humano e atua como uma importante barreira à entrada de produtos químicos, físicos e biológicos a partir do meio externo, além de produzir reações imunológicas que contam com a participação dos principais tipos de células encontrados na epiderme, que são os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans (ABBAS, 2008). Os queratinócitos são capazes de produzir citocinas que auxiliam no processo inflamatório, além de atuarem também como células apresentadoras de antígenos após estimulação (LUNGER et al., 1990). Na derme também é possível encontrar linfócitos T (células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), mastócitos e macrófagos, entre outras células.

A cascata inicial da resposta imune da pele pode ocorrer a partir de um trauma capaz de romper a barreira de queratina levando à possibilidade de exposição da derme direta ou indiretamente como ocorre a partir de uma picada de inseto.

Os queratinócitos ao serem rompidos, passam a liberar diferentes citocinas e quimiocinas, entre elas o Fator de Necrose Tumoral (TNF-  $\alpha$ ) e interleucina 1, que irá estimular a produção de outras interleucinas (SPELLBERG, 2000). Nos casos de invasão

por agentes infecciosos, as células de Langerhans existentes na epiderme e/ou as células dendríticas da derme capturam os antígenos e migram para o linfonodo de drenagem, onde podem apresentá-los aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em passagem pelo local, selecionando os clones respondedores aos antígenos apresentados e dando início à resposta imune específica. No intervalo entre a migração celular e ativação da resposta imune específica, a resposta imune inata age principalmente a partir de células presentes ou de migração rápida para a derme, como é respectivamente o caso de macrófagos, mastócitos e polimrfonucleares neutrófilos.

Na leishmaniose, tanto a resposta imune inata quanto a específica têm importância na qualidade da resposta imune capaz de controlar ou não a infecção. A presença de linfócitos T específicos ativados (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e suas subpopulações) é de grande importância para o controle da carga parasitária, pois estimulam e regulam a resposta imune específica, capaz de induzir citotoxicidade e atividade leishmanicida dos macrófagos. As subpopulações de linfócitos T são classificadas preferencialmente de acordo com o perfil de citocinas secretado. Entre as diferentes subpopulações de linfócitos T já descritas, merecem destaque as populações que caracterizam o perfil de resposta do tipo 1 (Th1) e de tipo 2 (Th2), mas outros perfis têm sido implicados na patogênese das leishmanioses (ABBAS, 2008).

A resposta imune típica detectada nos pacientes com a forma localizada (LCL) é caracterizada por uma produção de citocinas próinflamatórias, com predomínio de citocinas Th1, como INF- $\gamma$ , interleucina (IL)- 2 e TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral alfa) (MENDONÇA et al., 1986; CONCEIÇÃO-SILVA et al., 2010; SOUZA et al., 2012). Entretanto, 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 $\beta$ ). É sabido que uma resposta Th1 exagerada pode levar a dano tecidual e tem sido associada a imunopatogênese da LM (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; BACELLAR et al., 2002). Logo, uma resposta do tipo 1 equilibrada, com produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  são indispensáveis para o controle da infecção por *Leishmania* spp (GREEN et al., 1990).

Algumas funções das citocinas são essenciais para a evolução das lesões de LTA. O INF- $\gamma$ , por exemplo, estimula macrófagos a aumentar a atividade da enzima NOS2 (óxido nítrico sintase do tipo 2), aumentando conseqüentemente a produção de NO (óxido nítrico),

além de radicais superóxidos que são os principais mediadores da morte do parasita. Kima e Soong (2013) demonstraram que a infecção por espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* na LCL leva a uma ativação importante de macrófagos. Outras subpopulações de células T, 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- $\beta$ ) auxiliam na evolução ou regressão da doença dependendo da espécie da *Leishmania* e das características do hospedeiro (MASPI et al., 2016). Estudos demonstraram que a interleucina 17 (IL-17) está envolvida na cronicidade de lesões (BACELLAR et al, 2009). Ademais, a interleucina 22 (IL-22) está envolvida na imunidade do epitélio e da superfície das mucosas. Marreti-Mitra et al (2011) também observaram uma maior expressão de IFN- $\gamma$ , interleucina 10 (IL-10) e TGF- $\beta$  em lesões de pacientes que evoluíram com pior resposta ao tratamento. Barral-Neto et al (1995) demonstraram que infecções iniciais ocasionadas por *L. (V.) braziliensis* apresentam altos níveis de TGF- $\beta$ , o qual poderia estar sendo expresso por macrófagos infectados recentemente, estando assim ligado ao estabelecimento da infecção nos estágios iniciais da doença. Apesar de ainda faltarem alguns dados, atualmente já é possível realizar 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.

Em relação ao microambiente tecidual, pode-se demonstrar que as lesões de LTA são caracterizadas pela reação inflamatória do tipo crônica granulomatosa, com intensa infiltração linfoplasmocitária (QUINTELLA et al., 2009). Nas lesões de leishmaniose cutânea localizada (LCL) típicas, ou seja, naquelas com presença de úlceras com bordas infiltradas e fundo granuloso, já foi descrita a predominância de linfócitos T, macrófagos e neutrófilos (MORGADO et al., 2008). A formação da úlcera tem sido sugerida no modelo murino de estudo como sendo decorrente do processo inflamatório, e não necessariamente pela presença do parasita (BELKAID et al., 2000). Nestes casos os autores demonstraram que a lesão surge no momento em que o processo inflamatório começa a se instalar e que neste mesmo ponto a carga parasitária diminui. Por outro lado, o desequilíbrio da resposta tanto para uma diminuição quanto para a exacerbação da resposta do tipo 1 pode trazer danos que dificultem o controle da LTA. Neste contexto, Maspi et al (2016) sugeriram que uma resposta imune com predomínio de citocinas Tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-10) pode diminuir

a expressão da enzima NOS2 resultando na deficiência de estimulação dos macrófagos ao seu estágio parasiticida, auxiliando a proliferação parasitária e levando a uma doença grave de difícil tratamento, como no caso da forma cutânea difusa. Avaliações de casos de lesão mucosa têm sugerido que na leishmaniose mucosa (LM) ocorre uma resposta imune celular exacerbada e desequilibrada com aumento expressivo de citocinas Th1 como o INF- $\gamma$  (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.

Parasitas já 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., 1998b; OLIVEIRA-CAMARA et al, 2006; MORGADO et al., 2010, entre outros). Os indivíduos portadores de parasitos persistentes apesar de assintomáticos, podem apresentar recidivas da doença (SARAVIA et al., 1990). Por outro lado, o fato de haver persistência parasitária, contribui para que o sistema imune esteja sempre estimulado, mantendo um pool de células efetoras específicas aos antígenos de *Leishmania* spp induzindo uma ação protetora (GOMES-SILVA et al., 2014). Os mecanismos que levam à lesão mucosa permanecem obscuros, porém a persistência de parasitas 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 terapêuticas mais comuns em pacientes imunocomprometidos (HIV – positivos) (AMATO et al., 2004).

Apesar de todo o conhecimento acumulado e do reconhecimento do papel importante desempenhado pelas citocinas, o mecanismo pelo qual ocorre o controle da infecção ainda é desconhecido. Assim, caracterizar a resposta inflamatória local, o tipo e a função celular das células envolvidas têm-se mostrado importante na compreensão das diferentes apresentações clínicas de LTA. Neste sentido, estão disponíveis no mercado vários anticorpos capazes de reconhecer tipos celulares, citocinas e enzimas, entre outros, que podem auxiliar na construção desse painel de resposta inflamatória.

### 1.6.1 Uma breve introdução aos marcadores celulares e funcionais

Durante a infecção por parasitas do gênero *Leishmania* muitas células podem ser ativadas agindo diretamente ou indiretamente no local exposto, liberando citocinas e auxiliando no controle e captação do patógeno. Algumas células e marcadores funcionais são descritos abaixo:

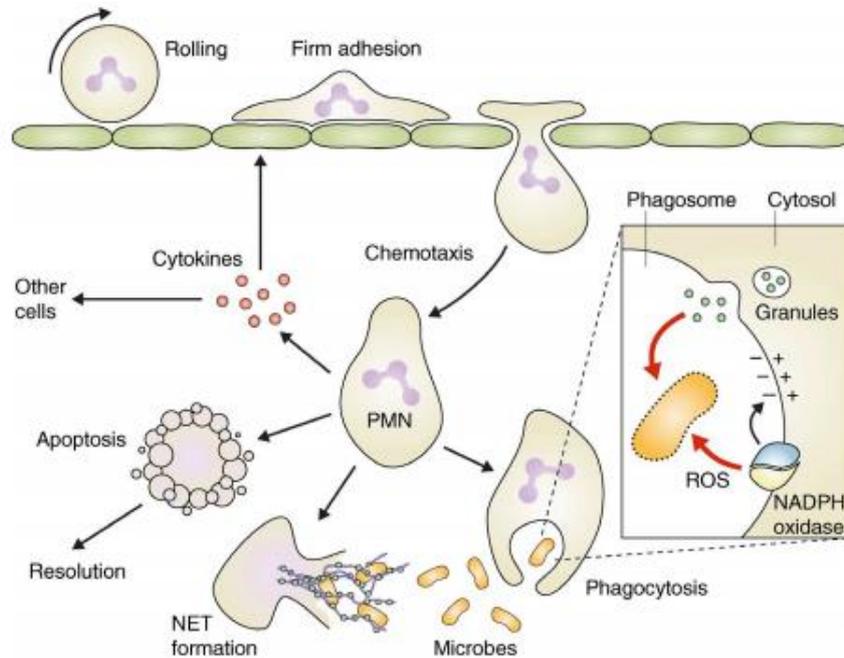
#### *Linfócitos e subpopulações*

A maioria dos linfócitos T é constituída por células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. As células T CD4<sup>+</sup> são diferenciadas e passam a apresentar diversas funções como a ativação das células do sistema imune inato, linfócitos B, células T citotóxicas (RISHI, 2012). A célula CD4 secreta interleucina-2 (IL2) rapidamente auxiliando na expansão clonal, e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), responsável pela ativação de macrófagos (ABBAS, 2008). As células T CD8<sup>+</sup> são citotóxicas e podem secretar Fator de Necrose Tumoral (TNF) além de expressar granzimas e perforinas, induzindo a morte das células infectadas por patógenos (DANTAS, 2013), além de expressar também IFN- $\gamma$ . As moléculas CD22 são expressas pelas células B e são responsáveis pela regulação da ativação destas células (ABBAS, 2008).

#### *Elastase neutrofílica (neutrófilo)*

Os neutrófilos são as primeiras células atraídas para o local da infecção. Trata-se de um polimorfonuclear com capacidade de eliminar o patógeno por diferentes mecanismos intra e extracelulares. Os neutrófilos podem romper e formar armadilhas extracelulares em forma de rede conhecidas como NETs, as quais são formadas por DNA, histona e enzimas, imobilizando patógenos e ajudando na fagocitose ou os matando diretamente por meio de proteases (figura 9) (MÓCSAI, 2013; KOLACZKOWSKA, 2013). Recentemente, nosso grupo demonstrou a relação entre a presença de neutrófilos e a proximidade espacial de formas amastigotas de *L. braziliensis* em lesões com evolução de 1 a 4 meses (MORGADO et al., 2015), sugerindo que este tipo de mecanismo poderia auxiliar na captação de amastigotas extracelulares e no controle da infecção. Outros estudos têm descrito o neutrófilo com uma função semelhante a “cavalo-de-tróia” na leishmaniose, que após ser infectado por *Leishmania* spp modifica sua superfície, sendo rapidamente fagocitado por macrófagos, liberando as amastigotas diretamente dentro do macrófago, impedindo a

ativação do mesmo e facilitando a sobrevivência e reprodução dos parasitas (JOHN & HUNTER, 2008; JOCHIM, 2009).



**Figura 9-** Neutrófilo e seus mecanismos de ação sobre o patógeno.

**Fonte:** Retirado Mócsai, 2013 (Em 27 de janeiro de 2018)

*CD68 (Macrófago), NOS2 (Óxido Nítrico Sintase) e IFN- $\gamma$  (Interferon-gama)*

Os macrófagos são ativados em resposta à invasão de microrganismos e podem causar lesão tecidual. Seu principal mecanismo é a fagocitose e destruição de patógenos, além da secreção de citocinas que estimulam a inflamação (ABBAS, 2008).

A *Leishmania spp* é um parasita intracelular obrigatório e os macrófagos são essenciais para sua sobrevivência. Ao mesmo tempo sua ação é responsável pela eliminação do parasita. Sua ativação pode ocorrer por via clássica ou alternativa. A ativação clássica é mediada pelos produtos de células Th1 e NK, particularmente IFN- $\gamma$ , que estimula macrófagos para ativar óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS2). Trata-se de uma enzima que catalisa L-arginina para gerar Óxido Nítrico (NO) (LIU, 2012), regulando a resposta inflamatória e sendo importante no controle da infecção por diferentes espécies

de *Leishmania*. Serarslan et al (2012) demonstraram uma correlação inversa entre a expressão de NO e a carga parasitária em pacientes de leishmaniose cutânea; além disto, observaram que os pacientes com até seis meses da doença apresentavam uma expressão de iNOS mais intensa, sugerindo que a produção precoce de NO seria importante para o controle da infecção.

Muitos macrófagos parasitados não obtêm sucesso na eliminação do parasita devido aos seus mecanismos de escape. Nas lesões tardias o número de leishmânias é reduzido e o grande número de macrófagos observados podem estar presentes para eliminação de células inflamatórias desnecessárias, controlando o ambiente e dando início ao processo de cicatrização (MORGADO et al., 2008). Além do IFN- $\gamma$ , outras citocinas podem auxiliar na ativação de macrófagos, regulando positivamente a expressão de iNOS e conduzindo à expressão de NO, tais como IL-1 e TNF (LIU, 2012).

#### *Natural Killer (CD56)*

Tem como principal função a lise de células infectadas e ativação de macrófagos. Além disto constituem uma importante fonte de IFN- $\gamma$ . Sua atividade e expansão são estimuladas por citocinas como IL-5 e IL-12. Quando ativadas, estas células liberam proteínas próximas à célula alvo, como por exemplo a perforina, auxiliando a entrada de outras proteínas no citoplasma destas células para sua destruição (ABBAS, 2008).

Células NK T constituem uma pequena porção de linfócitos com características de células NK e células T, podendo ser consideradas do sistema natural ou adquirido. Possuem habilidade de secretar grandes quantidades de citocina em um curto período de tempo quando ativadas (KORECK, 2002). Possuem vários receptores como o CD56 e podem suprimir ou ativar respostas imunes naturais e adquiridas (ABBAS, 2008). Prajeeth et al (2011) concluíram que apesar de ter um efeito potente no controle de infecções, a célula NK pode não conseguir reconhecer macrófagos infectados por leishmânias como alvos, provavelmente devido à falta de sinais adequados.

### *Ki67 (proliferação celular)*

A expressão da proteína Ki-67 está associada à proliferação celular. Faz-se presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) e não é detectável nas células em repouso (G0) (SCHOLZEN, 2000). São poucos os estudos de Ki-67 em doenças infecciosas, a grande maioria é voltada para avaliação de neoplasias. Morgado et al (2008) avaliaram a expressão da proteína em lesões de pacientes com LTA e observaram a presença de Ki-67, sugerindo proliferação celular no local da lesão.

### *Mastócitos (triptase de mastócitos)*

O papel dos mastócitos na leishmaniose ainda não é bem esclarecido. Alguns autores indicam o mastócito como fonte de IL-4. Já foi relatado por Amato et al (2008) uma redução do número de mastócitos após tratamento das formas cutâneas e mucosas da leishmaniose, associada com a diminuição de IL-4 e INF- $\gamma$ . As triptases dos mastócitos são parte de uma família de proteases de serina neutra que são predominantemente expressas em mastócitos e por esse motivo são utilizadas para a identificação deste tipo celular (ABRAHAM, 2002).

### *CD25 e Foxp3*

Células CD25<sup>+</sup> (marcador para o receptor de IL-2) são consideradas como células T regulatórias quando expressam Foxp3. Belkaid (2003) verificou que, em camundongos, células T reg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> controlavam a resposta Th2 excessiva, e em camundongos resistentes, controlavam a resposta Th1 e a sobrevivência do parasito.

### *ST2L*

É expressa em diversas células como macrófagos, mastócitos, células Th2 e basófilos (FURSOV et al., 2011). A relação de IL33/ST2L está relacionada à regulação de células T, ativação de macrófagos e produção de citocinas Th2 (LU et al., 2015).

Outros marcadores podem ser examinados, mas os acima descritos abrangem as principais características que definem o processo inflamatório como predominantemente do tipo 1, do tipo 2, do tipo inflamatório ou com predominância de mecanismos de regulação.

## 2 JUSTIFICATIVA

Um fator que tem sido pouco explorado é a relação entre resposta imune dos pacientes e a resposta terapêutica/ regressão das lesões. A verificação da dificuldade de controle terapêutico associado à presença de resposta imune do tipo 2, considerada não protetora, além da reversão de resposta de tipo 2 para tipo 1 no tratamento bem-sucedido da leishmaniose visceral indicam a possibilidade da modulação da resposta imune (THAKUR, KUMAR & PANDEY, 1991; BARRAL-NETO et al., 1997; SANTOS et al., 2002). No entanto, as condições imunológicas que influenciam ou determinam a reativação/recidiva da doença, assim como a cicatrização das lesões, ainda não estão totalmente esclarecidas (DA-CRUZ et al., 1994; BACELLAR et al., 2009; MORGADO et al., 2010, RODRIGUES et al., 2011, MARETTI-MITRA et al., 2011). Em 2004, Mendez e cols sugeriram que o equilíbrio entre estes dois tipos de resposta seria responsável pelo controle da resposta imune, mas a carga parasitária e a alteração nestas populações celulares poderiam levar à reativação da doença. Poucas são as informações existentes a respeito da resposta imune de casos de regressão espontânea precoce das lesões sem necessidade de tratamento.

Partindo-: (1) da dificuldade de obtenção de novos medicamentos para tratamento da LTA; (2) da crescente descrição de resistência aos medicamentos disponíveis; (3) do conhecimento prévio da importância da resposta imune celular *in situ* na evolução da lesão de LTA e (4) da crescente possibilidade de manejo da resposta imune em imunoterapias coadjuvantes, é importante a caracterização dos fatores que possam influenciar a evolução das lesões de LTA, particularmente daqueles relacionados à evolução da LCL para a cura clínica ou para o insucesso terapêutico, já que a LCL é a forma de apresentação clínica mais prevalente em nosso meio. A identificação destes marcadores poderia facilitar a identificação precoce e a intervenção nestes casos, por mudança da estratégia terapêutica. Além do mais, a caracterização de possíveis marcadores de evolução clínica da lesão pode, em médio prazo, levar ao desenvolvimento de novas formas de tratamento, inclusive imunoterápicos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta imune celular *in situ* de pacientes apresentando regressão espontânea precoce de lesões cutâneas de LTA, assim como boa e má resposta ao tratamento específico, correlacionando este achado com parâmetros clínicos e laboratoriais com vistas à detecção de possíveis padrões relacionados.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Comparar a expressão *in situ* de antígenos parasitários, a presença de diferentes populações celulares e marcadores funcionais entre as lesões primárias ativas de: A- pacientes com LCL que após o tratamento apresentaram boa ou má resposta ao tratamento específico e B- pacientes com LCL apresentando regressão espontânea precoce das lesões, descrevendo a relação espacial entre o agente infeccioso e a organização do infiltrado inflamatório;
- ✓ Comparar a distribuição de marcadores funcionais e celulares e verificar possíveis diferenças e semelhanças entre a distribuição de antígenos parasitários, populações celulares e marcadores funcionais *in situ* entre as lesões primárias ativas e as lesões no momento da detecção do insucesso terapêutico do mesmo paciente de LTA com má resposta ao tratamento específico;
- ✓ Verificar a possibilidade de produzir painéis de reconhecimento de resposta imune indicativa de cura ou recrudescimento das lesões que permitam a detecção de evoluções com potencial de gravidade.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 CASUÍSTICA

#### 4.1.1 Delineamento e população do estudo:

Trata-se de um estudo com 42 amostras de conveniência de pacientes atendidos no LapClin Vigileish, INI, FIOCRUZ, entre janeiro de 2005 e dezembro de 2015, com LCL apresentando regressão espontânea precoce (LRE) (n=14) ou boa (LBR) (n=14) ou má (LMR) (n=14) resposta ao tratamento específico com antimonial pentavalente 5 mg Sb<sup>+5</sup>/kg/dia. Foi considerado caso de LRE paciente com lesão epitelizada e sem crostas no período compreendido entre a data de investigação laboratorial da doença e a data prevista para a instituição do tratamento específico, e que apresentou exame parasitológico positivo para *Leishmania* spp. A definição de boa ou má resposta ao tratamento foi tomada em relação respectivamente a regressão total ou não da lesão após um ciclo de tratamento intramuscular com antimonial pentavalente, de acordo com os critérios dos médicos responsáveis pelo atendimento no LapClin VigiLeish. Foram classificados como pacientes de boa resposta aqueles que cicatrizaram após um ciclo completo com antimonial, e má resposta aqueles que não obtiveram cicatrização das lesões após um ciclo de tratamento completo. Para o estudo foram analisados: 1) fragmentos de lesões cutâneas obtidos por procedimentos de biópsia antes do tratamento (LRE, LBR e LMR-1); 2) nos casos de má resposta foi obtido um segundo fragmento de lesão do mesmo paciente no momento da confirmação do insucesso terapêutico (LMR-2); 3) dados sócio demográficos e clínicos/laboratoriais como idade, sexo, comorbidades, localização/características das lesões, resultados de identificação do parasita, histopatologia etc, obtidos do prontuário médico dos pacientes. As amostras de tecido estão estocadas em biorrepositório do Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) no Instituto Oswaldo Cruz (IOC), sob a guarda da Dra. Fátima Conceição-Silva.

#### **4.1.2 Considerações éticas**

Os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) relacionado ao “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” (anexo 4), que sistematiza o atendimento, a coleta de dados e exames dos pacientes, inclusive os procedimentos de biópsia. O delineamento do projeto e a metodologia empregada foram aprovados no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INI Fiocruz no projeto 014/2001 (anexo 5), classificado como de prazo indeterminado. Este subprojeto foi enviado para avaliação e revalidação no dia 11 de abril de 2016 e aprovado em 02 de maio de 2016. O termo de compromisso e responsabilidade (anexo 6) encontra-se no final deste trabalho.

#### **4.1.3 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos os pacientes atendidos no LapclinVigileish do INI/FIOCRUZ, entre janeiro de 2005 e dezembro de 2015, que tiveram informações em prontuário que pudessem identificar as características clínicas de interesse (LRE, LBR e LMR) como idade, sexo, quantidade e tamanho das lesões, tipo de lesão, tempo de evolução e tratamento. Esses pacientes tiveram amostra de tecido coletado durante o procedimento diagnóstico, estocado no biorrepositório sob a responsabilidade da Dra Fátima Conceição Silva.

Foram excluídos aqueles pacientes que, por qualquer motivo (com por exemplo recusa e nível de compreensão deficitário), não assinaram o TCLE do projeto “Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz”, extremos de idade (menores de 15 anos e maiores de 80 anos), devido às alterações fisiológicas da resposta imune, comorbidades que alteram de forma importante a qualidade da resposta imune (HIV-Aids, uso crônico de corticoide, diabetes mellitus descompensado, neoplasias, doenças auto-imunes, hepatites).

## 4.2 MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS

Os pacientes incluídos foram submetidos, durante a fase de investigação diagnóstica (da lesão primária ativa e em casos de má resposta também no momento da suspeita de insucesso terapêutico), 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”). Este procedimento é realizado pelos médicos responsáveis pelo atendimento dos pacientes e a amostra para o estudo é preparada pela equipe do LapClin VigiLeish e enviado ao LIP- IOC para avaliação da resposta imune *in situ* por imunohistoquímica [criopreservado em blocos de OCT (Tissue-Tek, USA)].

### 4.2.1 Técnica de Imunohistoquímica (IHQ)

A técnica de Imunohistoquímica foi realizada em cortes de tecido de 3 a 4- $\mu$ m apostos em lâmina silanizada (DakoCytomation, CA, USA) através de técnicas previamente descritas (MORGADO et al., 2008, MORGADO et al., 2010) em uma sequência de: hidratação em PBS, bloqueio da peroxidase endógena, lavagem em PBS seguida de bloqueio de reações inespecíficas com soro normal de cabra (Zymed Lab Inc, San Francisco, CA, USA). A seguir, 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. Os anticorpos foram: anti-CD4, -CD8, -CD22, -elastase neutrofílica, -mastócito, -CD56, -CD25, -Ki-67 e -CD68 (Dako/ eBioscience), -NOS2 (iNOS) (BD Transduction), IFN- $\gamma$ , Foxp3 (BD Biosciences Pharmingen), ST2L (mdbioscience) e anti-*Leishmania* sp (Dr MF Madeira- INI-Fiocruz). 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 contracorados com hematoxilina de Mayer (Dako) e cobertos com solução de montagem (Faramount- Dako) e lamínula. A supressão dos anticorpos primários foi usada como controle negativo. A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Nikon E-200, Nikon, Tóquio, Japão), e a

porcentagem de células marcadas foi determinada através da contagem de 500 células ou 10 campos (aumento, X1000). Em particular para NOS2 a intensidade das marcações foi determinada por área marcada da seguinte forma: discreto (1 sítio positivo por campo 20x), moderado (2 a 3 sítios positivos por campo), intenso (4 a 5 sítios positivos por campo) e muito intenso (mais de 5 sítios positivos por campo) como previamente descrito (MORGADO et al., 2015).

#### 4.3 PLANO DE ANÁLISE

Foi construído um banco de dados específico para o estudo utilizando-se o *software* R 3.3.2 (R Foundation for Statistical Computing, Brasil). Para realização de análises e testes contamos com a colaboração da Dra Raquel Vasconcellos (INI- Fiocruz). Foi realizada análise descritiva com medidas de tendência central e dispersão para as variáveis contínuas e medidas de proporção para as variáveis categóricas. Os resultados obtidos foram comparados entre os três grupos juntos ou separados dois a dois. No grupo de má resposta ao tratamento foram ainda comparadas as lesões de um mesmo paciente na ocasião do diagnóstico primário (LMR-1) e da confirmação do insucesso terapêutico (LMR-2). A análise dos resultados de imunohistoquímica foi feita pela análise de amostras não relacionadas através do teste não-paramétrico de Mann – Whitney para comparação de lesões primárias ativas. Para a avaliação das lesões primárias ativas e lesões no momento da detecção da má resposta ao tratamento num mesmo paciente utilizamos o teste de Wilcoxon para amostras pareadas e o teste Kruskal Wallis para comparação de três ou mais grupos, com correção de Bonferroni, além do teste exato de Fisher para análise da expressão de NOS2. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificação da normalidade. Os dados foram apresentados em distribuição como média  $\pm$  SEM (erro mínimo) ou mediana. Quando aplicável, foram considerados como significantes os p valores  $\leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Foram estudados 42 pacientes com lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar americana. A média de idade destes pacientes foi de 35 anos  $\pm$  11,66 anos, sendo o sexo masculino o mais prevalente ao todo (69,04 %; 29/42). Quando comparados os grupos LRE (regressão espontânea precoce), LMR (má resposta ao tratamento) e LBR (boa resposta ao tratamento), não foi identificada diferença entre eles em relação a idade (p-valor: 0,936) ou sexo (p-valor: 0,127). A média do maior diâmetro de lesão foi de 26 mm (com variação entre 4 e 90 mm), não havendo diferença entre os grupos avaliados (p-valor = 0,60). Os grupos apresentaram diferença em relação a quantidade de lesões (p-valor 0,023) sendo que os casos de LMR eram aqueles que apresentavam maior número de lesões. Ainda é preciso notar que todo o grupo LRE apresentava média de uma lesão (tabela 1).

Apesar de não ser ter sido observada diferença estatística, os membros inferiores pareceram ser os mais afetados (45,23%), seguido dos membros superiores (40,47%), tronco (19,04 %), pescoço (9,52%) e cabeça (7,14%). Em relação ao tipo de lesão, 31 pacientes (73,80 %) apresentaram o tipo ulcerosa, 8 (19,04 %) placa ulcerada e 3 (7,14 %) apresentaram outros tipos. Não houve diferenças de distribuição entre os tipos de lesão entre os grupos estudados. Todos os pacientes dos grupos LMR e LBR foram tratados com antimoniato de meglumina na dose 5 mg  $Sb^{+5}$ /kg/dia.

A mediana do tempo de evolução das lesões até o momento do diagnóstico no grupo LRE foi de 2,5 meses, seguido de 2 meses para os LBR e 1,75 para LMR. Não foram encontradas diferenças entre o tempo de evolução dos três grupos (p-valor: 0,08) (tabela 1). Um paciente do grupo de resolução espontânea foi diagnosticado com ascaridíase e tricuriase. Informações clínicas gerais dos grupos podem ser observadas na tabela 1 e informações individuais de cada paciente estão nos anexos 1,2 e 3.

**Tabela 1-** Dados clínicos dos pacientes de LTA com diferentes evoluções para cura. INI, Fiocruz entre 2005 a 2015

Dados clínicos		LRE	LBR	LMR	p valor
<b>Sexo</b>	<i>Masculino</i>	7	12	10	0,127
	<i>Feminino</i>	7	2	4	
<b>Idade (anos)</b> Média ±SD (mínimo-máximo)		37 ± 15,21 (17-54)	35,85 ± 9,67 (24-55)	37,42 ± 10,14 (21-52)	0,936
<b>Comorbidade*</b>	<i>Sim</i>	7	2	6	0,113
	<i>Não</i>	7	12	8	
<b>Evolução (meses)</b> Mediana (mínimo-máximo)		2,5 (1-24)	2 (1-12)	1,75 (1-4)	0,08
<b>Número de lesões</b> Média ±SD (mínimo-máximo)		1 (1-1)	1 ± 0,75 (1-3)	1,5 ± 0,87 (1-9)	<b>0,023**</b>
<b>Tamanho das lesões</b> (mm) mediana (mínimo-máximo)		25,5 (10-80)	27,5 (4-80)	32,5 (5-90)	0,609

\* HAS (Hipertensão Arterial Sistêmica), herpes, nefropatia, tabagismo, diabetes, ascaridíase e amebíase foram consideradas comorbidades

\*\*Kruskal Wallis

Para confirmação do diagnóstico de leishmaniose, alguns métodos foram utilizados além da clínica e história epidemiológica. Podemos observar a positividade de cada um na tabela 2.

**Tabela 2** –Positividade dos exames diagnósticos nos diferentes grupos de pacientes com LCL atendidos no INI, Fiocruz entre 2005-2015

GRUPO	CULTURA (+/TOTAL) (%)	IMPRINT (+/ TOTAL) (%)	AMASTIGOTA NA HP (+/ TOTAL) (%)	SOROLOGIA (+/ TOTAL) (%)	IDRM (+/ TOTAL) (%)	PCR (+/ TOTAL) (%)
<b>LMR</b>	14/14 ( 100%)	9/13 ( 69% )	11/14 ( 78% )	10/10 ( 100% )	11/11 ( 100% )	2/2 ( 100%)
<b>LBR</b>	14/14 ( 100%)	2/5 ( 40% )	8/14 ( 57% )	10/11 ( 91% )	12/12 ( 100% )	NR
<b>LRE</b>	1/13 ( 7% )	0/13 ( 0% )	7/14 ( 50% )	9/13 ( 69% )	11/11 ( 100% )	6/14 ( 42% )
<b>Total</b>	29/41 ( 71%)	11/31 (35 %)	23/42 ( 55%)	29/34 (85%)	34/34 ( 100%)	8/16 ( 50%)

**LMR:** Leishmaniose Má Resposta; **LBR:** Leishmaniose Boa Resposta; **LRE:** Leishmaniose Resolução Espontânea  
**IDRM:** intradermoreação de Montenegro **HP:** Histopatologia NR- Não realizado

Em relação ao isolamento em cultivo, tanto os pacientes do grupo LMR quanto os do grupo LBR apresentaram 100 % de positividade, enquanto no grupo LRE apenas um paciente apresentou somente uma cultura positiva, assim, os pacientes foram confirmados através de PCR e/ou pela presença de amastigota no histopatológico.

Outros métodos como *imprint*, IDRM e sorologia também foram realizados. Os valores médios para IDRM em cada grupo foram: LMR- 12mm ± 5,43; LBR- 21,5mm ± 6,55; LRE- 14,5mm ± 12,91. Quando o IDRM foi comparado entre os três grupos, notamos diferença significativa (p valor= 0,01). Esta significância era obtida basicamente pelos valores de IDRM de LMR, pois este apresentava IDRM de menor diâmetro que os demais.

A Sorologia não evidenciou diferenças estatísticas entre os grupos (LMR X LBR X LRE: p valor- 0,169).

Os pacientes de resolução espontânea apresentaram um menor número de exames parasitológicos durante a confirmação diagnóstica, inversamente ao grupo de má resposta, onde 50 % dos pacientes apresentaram 3 ou mais exames positivos (tabela 3).

**Tabela 3-** Número de exames parasitológicos positivos durante a confirmação de LTA em cada grupo. INI, Fiocruz. 2005-2015

GRUPO	1+	2+	3 ou mais	Total de pacientes
<b>LMR</b>	1 paciente (7 %)	6 pacientes (43 %)	7 pacientes (50 %)	14 (100%)
<b>LBR</b>	6 pacientes (43 %)	6 pacientes (43 %)	2 pacientes (14 %)	14 (100%)
<b>LRE</b>	14 pacientes (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	14 (100%)

**LMR:** Leishmaniose Má Resposta; **LBR:** Leishmaniose Boa Resposta; **LRE:** Leishmaniose Resolução Espontânea  
**IDRM:** intradermorreação de Montenegro **HP:** Histopatologia

O acompanhamento longitudinal por pelo menos dois anos, não demonstrou recidiva das lesões cutâneas nem surgimento de lesões mucosas no grupo de resolução espontânea. Da mesma maneira, os casos de LBR responderam bem ao primeiro ciclo de tratamento, com cicatrização das lesões cutâneas e o acompanhamento longitudinal não evidenciou novas lesões cutâneas ou mucosas. Já o grupo de LMR necessitou de outros ciclos de tratamento como demonstrado no quadro 1, Todos os casos obtiveram cura após um ou mais ciclo de tratamento e mantem-se curados até o momento.

<b>Tratamento</b>	<b>LMR*</b>	<b>LBR**</b>
<b>Primeiro tratamento</b>		
Antimoniato meglumina	14/14 (100%)	14/14 (100%)
Nenhum (cura espontânea)	0	0/14
<b>Primeiro Desfecho</b>		
Cura	0	14/14 (100%)
Insucesso	14/14 (100%)	0
<b>Segundo tratamento</b>		
Antimoniato meglumina	14/14 (100%)	-
Anfotericina B	0	-
<b>Segundo Desfecho</b>		
Cura	7/14 (50 %)	-
Falha	7/14 (50 %)	-
<b>Terceiro tratamento</b>		
Antimoniato meglumina	5/7 (71,4 %)	-
Anfotericina B	2/7(28,6 %)	-
<b>Terceiro Desfecho</b>		
Cura	4/7 (57,1 %)	-
Falha	3/7 ( 42,9 %)	-
<b>Quarto tratamento</b>		
Antimoniato meglumina	2/3 (66,7 %)	-
Pentamidina	1/3 ( 33,3%)	-
<b>Quarto Desfecho</b>		
Cura	3/3 (100%)	-

**Quadro 1-** Acompanhamento do tratamento dos casos de LMR e LBR

\* **LMR:** Leishmaniose Má Resposta; \*\* **LBR:** Leishmaniose Boa Resposta;

## 5.2 RESPOSTA IMUNE *IN SITU* VERIFICADA POR IMUNOHISTOQUÍMICA DAS LESÕES

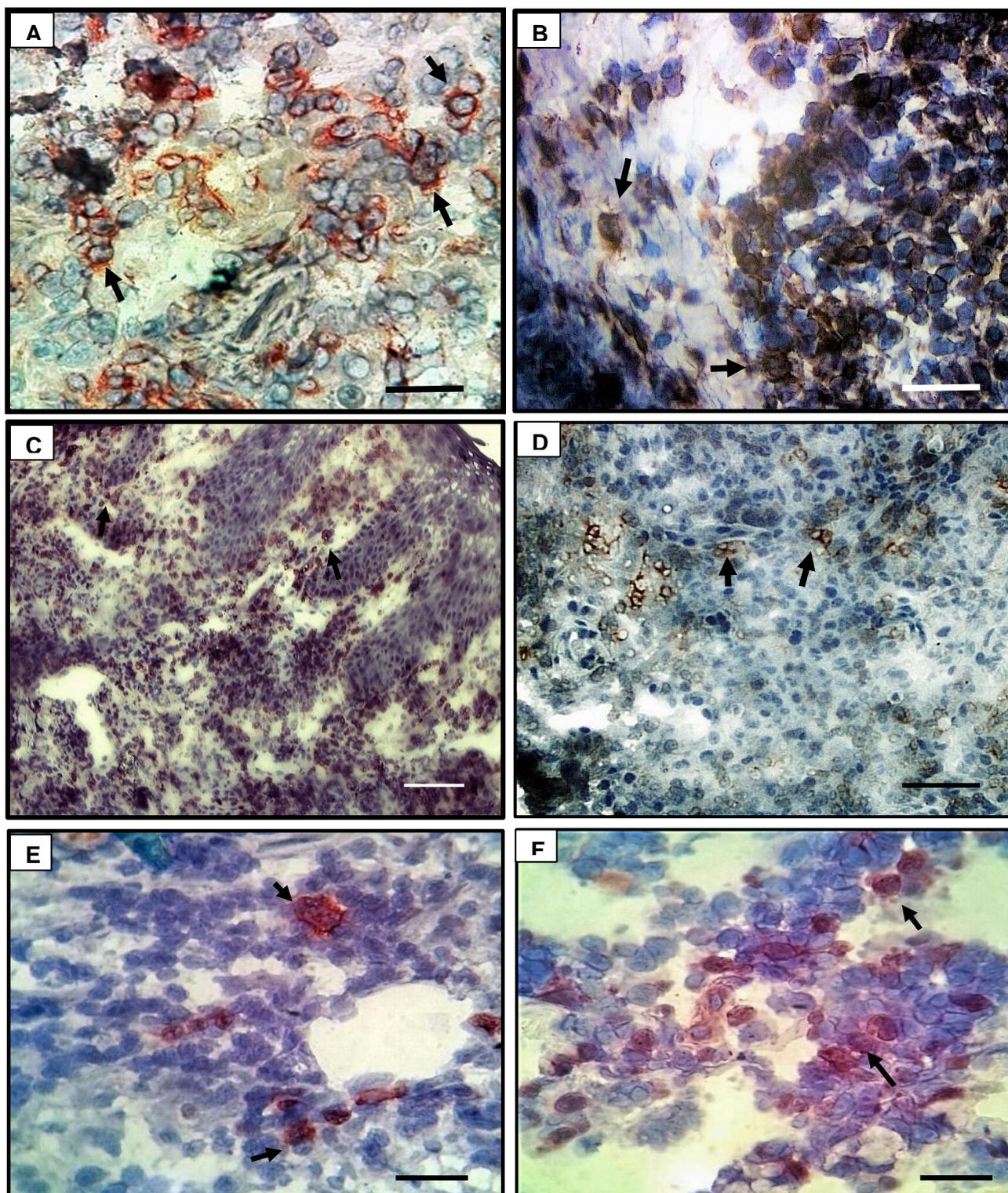
### 5.2.1 Verificação de diluições ótimas e marcação com os anticorpos utilizados nos tecidos de lesão de LTA

Foram realizados testes para avaliar a melhor diluição para cada marcador, para adaptação do protocolo ao projeto, pois cada anticorpo e tecido apresentam suas características particulares. Na tabela 3 são demonstradas diluições ótimas de cada um.

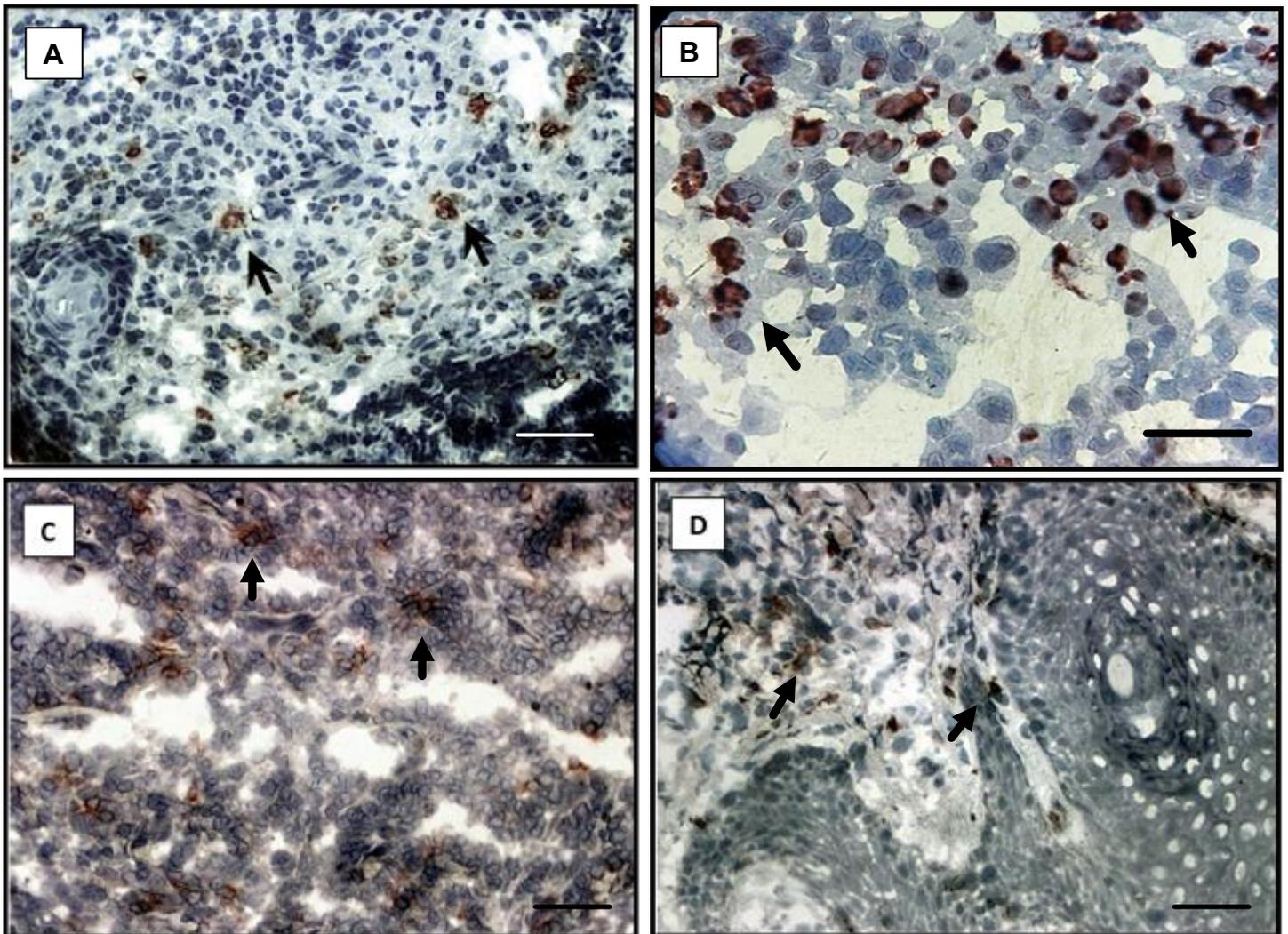
**Tabela 4-** Marcadores, diluições ótimas e funções. Laboratório de Imunoparasitologia, IOC- Fiocruz

Marcador	Fabricante	Diluição ótima	Concentração ( µl/mL)	Detecção
CD4	DAKO	1:100	4,94	Subpopulação CD4 de linfócitos T
CD8	DAKO	1:100	1,57	Subpopulação CD8 de linfócitos T
CD25	BD Pharmingen	1:100	2,14	Receptor de IL2
CD22	DAKO	1:100	0,005	Linfócitos B
CD68	DAKO	1:300	0,79	Macrófago
Elastase neutrofilica	DAKO	1:100	0,42	Neutrófilo
NK (CD56)	DAKO	1:100	3,71	Células Natural Killer
KI67	DAKO	1:100	0,41	Proliferação celular
Mastócito	DAKO	1:200	0,55	Mastócitos ativados
ST2L	Bioscience – BD	1:100	0,05	Marcador de populações reguladoras respondedoras a IL-33
NOS2	T cell transduction	1:100	2,50	Produção de óxido nítrico
Foxp3	Bioscience – BD	1:100	0,5	Marcador expresso em células T regulatórias
IFN-γ	Pharmingen – BD	1:100	0,5	Interferon gama (resposta tipo 1)

Com essas diluições verificamos uma menor quantidade de fundo em todos os grupos. Marcações podem ser vistas nas figuras 10 e 11.



**Figura 10-** Imunohistoquímica de lesões de LTA. Marcações de **CD4** - (A) lesão ativa primária (LMR) e (B) lesão de insucesso terapêutico (LMR). Barra: 10  $\mu$ m. **CD8**- (C) lesão ativa primária (LMR), e (D) lesão de insucesso terapêutico (LMR). Barra: 25  $\mu$ m. **Ki67** (E) Lesão ativa de LBR. (F) lesão ativa primária (LMR). Barra: 10  $\mu$ m



**Figura 11-** Imunohistoquímica de lesões de LTA. Setas mostrando marcações com elastase neutrofílica em **(A)** Lesão ativa primária (LMR). Barra: 25  $\mu$ m e **(B)** lesão de LBR. Barra: 10  $\mu$ m. Células Natural Killer (CD56) em lesão primária (LMR) **(C)** e lesão de LBR **(D)**. Barra: 25  $\mu$ m

## **5.2.2 Perfis celular e funcional observados no infiltrado inflamatório presente nas lesões de LTA nos grupos avaliados (LRE, LBR, LMR-1 e LMR-2)**

### **5.2.2.1 CD4, CD8, neutrófilo, CD22, CD68, CD56, mastócitos, CD25, ST2L, Foxp3, Ki-67 e IFN- $\gamma$**

As médias percentuais e desvios-padrão das quantidades de células CD4 (linfócitos T do grupo de diferenciação 4), CD8 (linfócitos T do grupo de diferenciação 8), neutrófilo, CD22 (linfócitos B), CD68 (macrófagos), CD56 (células NK) e mastócitos, assim como CD25 (receptor de IL-2), ST2L (receptor de IL-33), Foxp3 (marcador de células reguladoras da resposta imune), Ki-67 (proliferação) e IFN- $\gamma$  (citocina interferon gama), distribuídos por grupo e tipo de marcador estão demonstrados no quadro 2. Para os grupos independentes dois a dois foram realizados dois tipos de análise: a comparação não paramétrica de grupos pelo teste de Mann-Whitney (quadro 4 e 5) e a análise pelos métodos de Bonferroni ou Steel (figura 12 a 17) que se caracterizam por serem pós testes que confirmam as diferenças entre grupos. Por último, quando as lesões LMR1 e LMR2, provenientes de um mesmo paciente em dois momentos diferentes eram analisadas, foi aplicado o teste de Wilcoxon para amostras dependentes.

Os resultados de comparação geral, quando todos os grupos eram analisados em conjunto, se mostraram significativamente diferentes em praticamente todos os marcadores, exceto na comparação de mastócitos e Foxp3 em LMR-1 x LBR x LRE. No quadro 2 podem ser verificadas as distribuições percentuais dos diversos marcadores em cada grupo de estudo e no quadro 3, 4 e 5 podem ser visualizadas as análises comparativas entre todos os grupos.

<b>Marcador <sup>1</sup></b>	<b>LRE % (X + SD) (Min-Máx)</b>	<b>LBR % (X + SD) (Min-Máx)</b>	<b>LMR-1 % (X + SD) (Min-Máx)</b>	<b>LMR-2 % (X + SD) (Min-Máx)</b>
<b>CD4</b>	30,59 ± 2,38 (27,18 - 34,31)	33,20 ± 5,34 (26,20 - 38,98)	24,26 ± 3,49 (23,17 - 31,60)	24,34 ± 5,72 (18,31 - 37,12)
<b>CD8</b>	26,81 ± 2,76 (21,34- 33,20)	31,72 ± 4,56 (27,60 - 37,79)	30,56 ± 4,11 (19,72 - 35,59)	25,70 ± 5,64 (20 - 40,40)
<b>CD22</b>	13,46 ± 1,33 (12,10- 18,75)	22,86 ± 4,50 (14,21 - 28,43)	23,38 ± 5,60 (13 - 30,88)	19,91± 6,78 (11,54 - 30,74)
<b>CD68 (MØ)</b>	17 ± 5,40 (4,89- 28,14)	29,04 ± 5,41 (19,32 - 38,10)	32,36 ± 7,49 (17,06- 41,45)	31,54 ± 6,55 (20,79 - 41,51)
<b>CD56 (NK)</b>	7,76 ± 3,02 (4,31- 22,38)	23,58 ± 4,53 (11,38 - 28,37)	26,10 ± 5,57 (15,20- 37,08)	22,38 ± 6,19 (10 - 34,95)
<b>Mastócito</b>	7,44 ± 2,81 (3,33 – 13,40)	7,81 ± 3,27 (4- 15,70)	5,51± 2,29 (3- 10)	5,78 ± 2,15 (3,45- 12)
<b>Neutrófilo</b>	19,49 ± 1,13 (10,79 -36,19)	24,18 ± 4,90 (20 - 36,40)	26,17 ± 4,63 (16,37 - 31,51)	21,85 ±5,86 (10,21 - 28,52)
<b>Ki67</b>	8,98 ± 0,03 (4,79-17,25)	17,70 ± 0,04 (14,66 - 26,08)	20,10 ± 0,024 (19,02- 24,80)	21,40 ± 0,033 (16- 23,40)
<b>Foxp3</b>	12,92 ± 4,52 (7,69- 24,75)	17,40 ± 4,64 (17,19 - 17,60)	14,38 ± 4,5 (10 -22,66)	12,56 ± 4,31 (6-20,73)
<b>CD25</b>	6,07 ± 6,40 (3,41 – 19,96)	18,23 ± 4,14 (10,38 - 23,72)	22,45 ±5,44 (10 - 29,15)	19,03± 7,08 (10,23 -26,83)
<b>IFN-γ</b>	24,67 ± 4,74 (13,22 – 32,61)1)	18,08 ± 5,18 (4,64- 24,02)	12,28 ± 4,11 (7,10 – 21)	13,45 ± 3,30 (8,74 – 19,44)
<b>ST2L</b>	7,12 ± 0,02 (4- 11,89)	12,49 ± 9,32 (8,04 – 23,80)	9,72 ± 7,13 (6 – 17,18)	9,90 ± 3,37 (5,33 – 19,18)

**QUADRO 2-** Análise quantitativa dos tipos celulares e marcadores funcionais presentes no infiltrado inflamatório das lesões de LTA de acordo com os grupos estudados

1-Resultados de marcações realizadas apresentados em média, desvio padrão, mínimo e máximo

**LMR-1:** Leishmaniose Má Resposta Primária; **LMR-2:** Leishmaniose Má Resposta Recidiva; **LBR:** Leishmaniose Boa Resposta;

**LRE:** Leishmaniose Resolução Espontânea

Marcador	Todos os grupos	LMR-1 X LBR X LRE	LMR-2 X LBR X LRE
CD4	0,0001	<0,0001	<0,0001
CD8	<0,0001	0.021	0.020
CD22	<0,0001	0.0001	0.0001
CD68	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CD56	0,0001	<0,0001	<0,0001
Mastócito	0.05	0.073	0.09
Neutrófilo	0.003	0.002	0.004
Ki67	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Foxp3	0.027	0.136	0.011
CD25	<0,0001	<0,0001	<0,0001
IFN- $\gamma$	<0,0001	<0,0001	<0,0001
ST2L	<0.0001	0.0001	0.0001
Teste	<i>Kruskal wallis</i>	<i>Kruskal wallis</i>	<i>Kruskal Wallis</i>

**Quadro 3** – Análise comparativa dos tipos celulares e marcadores funcionais entre os grupos estudados.

**LMR-1:** Leishmaniose Má Resposta Primária; **LMR-2:** Leishmaniose Má Resposta Recidiva; **LBR:** Leishmaniose Boa Resposta; **LRE:** Leishmaniose Resolução Espontânea

Marcador	LMR-1 X LBR	LMR-1 X LRE	LBR X LRE
CD4	0.002	<0,0001	0.454
CD8	0.358	0.055	0.01
CD22	0.454	<0,0001	<0,0001
CD68	0.035	<0,0001	<0,0001
CD56	0.039	<0,0001	<0,0001
Mastócito	0.050	0.053	0.927
Neutrófilo	0.581	0.005	0.001
Ki67	0.002	<0,0001	0.003
Foxp3	0.265	0.454	0.048
CD25	0.069	<0,0001	<0,0001
IFN- $\gamma$	0.005	<0,0001	0.002
ST2L	0.753	<0,0001	<0,0001
Teste	<i>Mann-whitney</i>	<i>Mann-whitney</i>	<i>Mann-whitney</i>

**Quadro 4** - Comparação estatística dos resultados de imunohistoquímica entre os grupos LRE, LBR e LMR-1

**LMR-1:** Leishmaniose Má Resposta Primária; **LMR-2:** Leishmaniose Má Resposta Recidiva; **LBR:** Leishmaniose Boa Resposta; **LRE:** Leishmaniose Resolução Espontânea

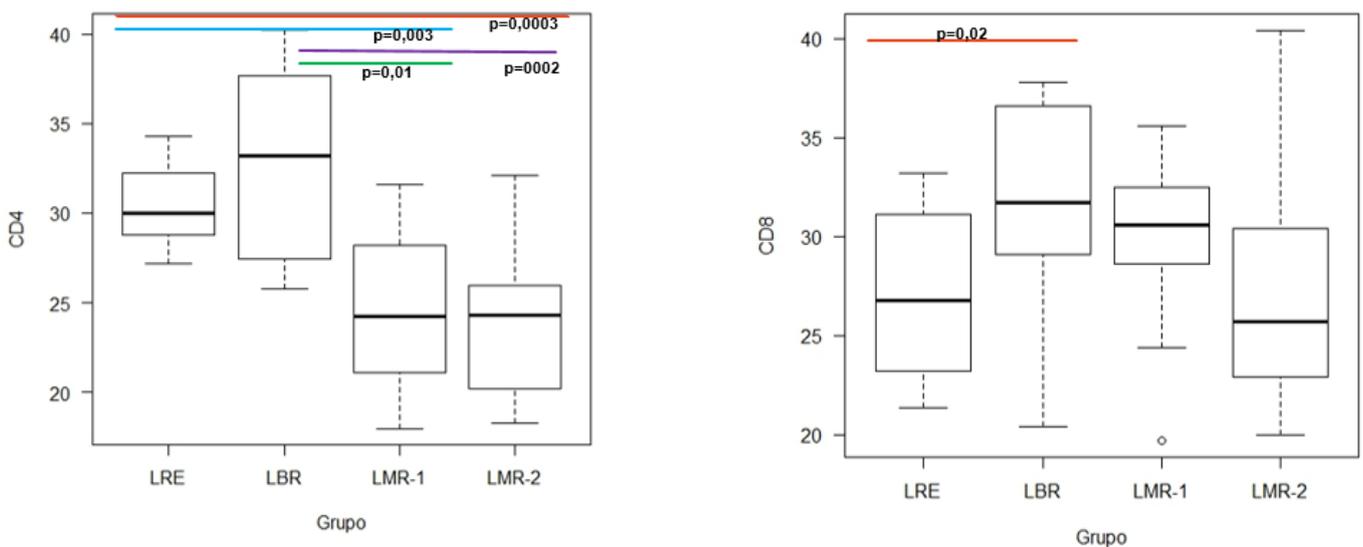
Marcador	LMR-2 X LMR-1	LMR-2 X LBR	LMR-2 X LRE
CD4	0.431	<0,0001	<0,0001
CD8	0.09	0.029	0.874
CD22	0.81	0.667	0.002
CD68	0.549	0.164	<0,0001
CD56	0.194	0.376	<0,0001
Mastócito	0.607	0.066	0.069
Neutrófilo	0.076	0.027	0.306
Ki67	0.597	0.024	<0,0001
Foxp3	0.104	0.003	0.285
CD25	0.406	0.734	<0,0001
IFN- $\gamma$	0.579	0.003	<0,0001
ST2L	0.027	0.001	0.069
Teste	<i>Wilcoxon</i>	<i>Mann-whitney</i>	<i>Mann-whitney</i>

**Quadro 5-** Comparação estatística dos resultados de imunohistoquímica entre os grupos LMR2, LMR1, LBR e LRE

**LMR-1:** Leishmaniose Má Resposta Primária; **LMR-2:** Leishmaniose Má Resposta Recidiva; **LBR:** Leishmaniose Boa Resposta; **LRE:** Leishmaniose Resolução Espontânea

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> apresentavam uma distribuição homogênea pela derme em todos os grupos. Ao analisar a concentração destas células nos vários grupos estudados, pode-se verificar uma predominância dos dois tipos celulares nas lesões que apresentaram boa resposta ao tratamento (LBR) quando estas foram comparadas com as demais. Usando os dois testes para comparação de amostras dois a dois, a maior concentração de células CD4<sup>+</sup> se mantinha estatisticamente significativa quando os casos de boa resposta eram comparados aos casos de má resposta terapêutica (figura 12). No entanto, os valores eram semelhantes entre as lesões de LBR e LRE (p=0,454) (quadro 4)

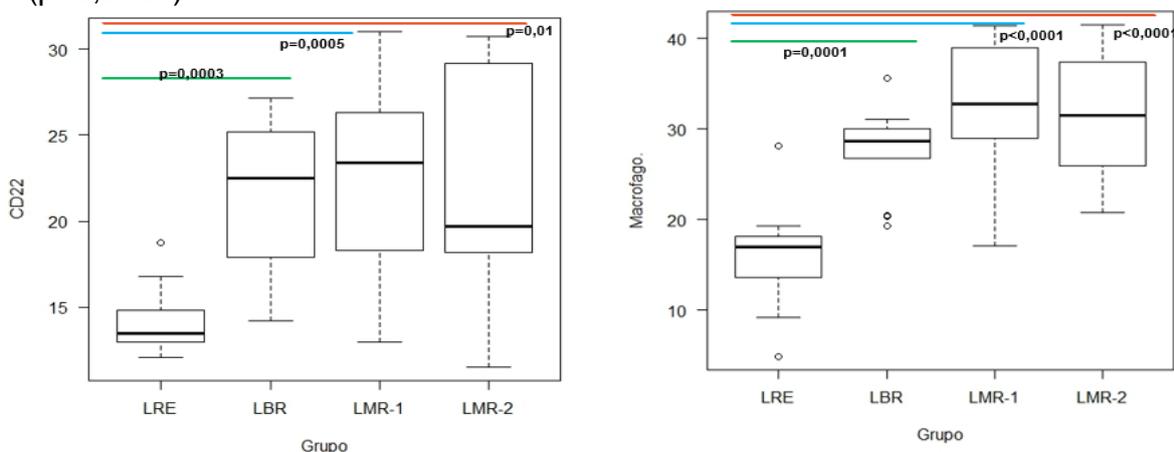
Interessante notar que, em relação às células CD8<sup>+</sup>, quando os grupos eram comparados dois a dois, as diferenças eram menores. Como pode ser visto no quadro 4, os valores eram considerados semelhantes quando comparados com casos de LBR com LMR-1 (p=0,358), mas tanto os casos de insucesso terapêutico, quanto de cura espontânea precoce apresentavam menor concentração de células CD8<sup>+</sup> (ver também quadro 2). Por último, apesar das diferenças observadas entre LRE e LBR (p= 0,02 – figura 12), os casos de má resposta terapêutica apresentavam semelhanças quando as duas lesões do mesmo paciente eram comparadas (p=0,06) (quadro 5).



**Figura 12** Distribuição percentual de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nas lesões dos grupos estudados. Análise estatística realizada por Kruskal wallis. CD4<sup>+</sup> com correção de Bonferroni e CD8<sup>+</sup> por Steel.

Os linfócitos B CD22<sup>+</sup> eram encontrados em pequenos grupamentos com distribuição heterogênea pelo tecido. Ao comparar os grupos de pacientes entre si identificou-se uma diferença na infiltração destas células nos tecidos das lesões dos grupos estudados ( $p \leq 0,0001$ ) (quadro 3), apesar de estarem em menor número que as células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. No entanto, quando as comparações eram realizadas por associação entre os grupos dois a dois (figura 13 e quadros 4 e 5) identificou-se que essa diferença se fazia basicamente às custas de LRE que mostrava menor quantidade deste tipo celular, já que as avaliações entre os demais grupos não mostraram significância (LBR x LMR-1  $p=0,454$ ; LBR x LMR2  $p=0,0667$  e LMR-1 x LMR-2  $p=0,734$ ).

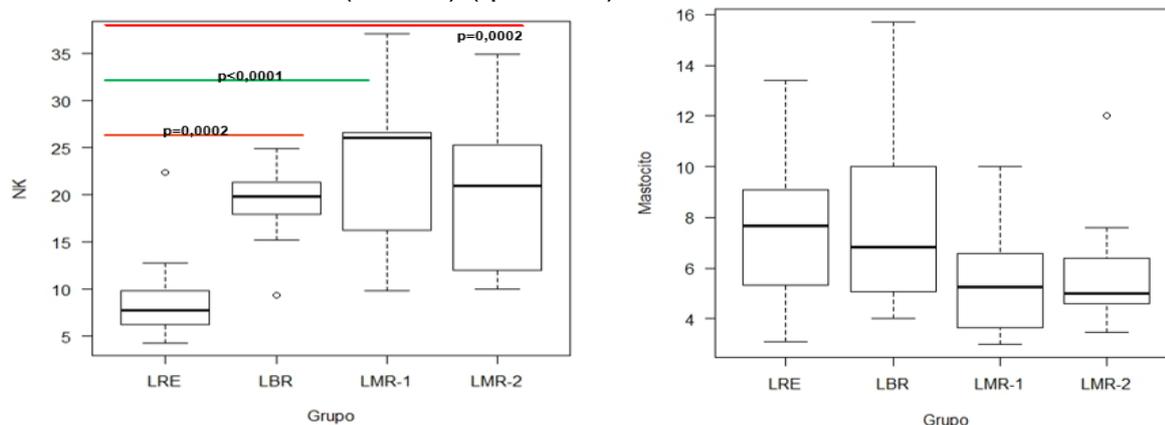
Os macrófagos CD68<sup>+</sup> distribuíam-se de forma homogênea por todo o infiltrado. A identificação destas células nas lesões evidenciou que o grupo LRE era o que apresentava as menores concentrações (quadro 2). Além disso, sua identificação variou muito de paciente para paciente dentro de cada grupo (quadro 2), mostrando haver heterogeneidade intrínseca entre os pacientes. Mesmo assim, quando os grupos eram comparados entre si (quadro 3), verificou-se diferença bastante significativa entre eles ( $p < 0,0001$ ). Com esta informação foi necessária a identificação de quais grupos apresentavam as maiores concentrações de macrófagos. A análise dois a dois (figura 13) identificou uma semelhança entre LMR-1 e LMR2 ( $p=0,603$ ; quadro 5), entre LMR-2 e LBR ( $p=0,164$ ) e LMR-1 e LBR ( $p=0,21$ ). Já em relação a LRE, a análise demonstrou que este grupo apresentava o menor número de macrófagos em relação aos demais grupos e por isso altamente significantes ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 13-** Distribuição percentual de linfócitos B CD22<sup>+</sup> e macrófagos nas lesões dos grupos estudados. Análise estatística realizada por Kruskal wallis com correção de Bonferroni.

As células NK CD56<sup>+</sup> se distribuíam de maneira homogênea pelo tecido das lesões. Ao observarmos os valores percentuais obtidos para CD56<sup>+</sup> notamos uma variação não só entre os grupos, sendo que LRE nitidamente apresentava as menores concentrações (quadro 2), como também dentro de cada grupo. Esta característica levou a identificação de diferença significativa ( $p \leq 0,0001$  - quadro 3) quando os grupos eram comparados em conjunto. No entanto, devido a variação entre os grupos, as análises dois a dois demonstraram semelhança entre LBR e LMR-2 ( $p=0,376$ ) e entre as duas lesões do grupo má resposta (LMR-1 x LMR-2  $p=0,194$ ) (quadro 5). Nos demais grupos foi verificada diferenças significantes variadas ( $p=0,0002$  a  $p < 0,0001$ ) (figura 14) sempre com importante influência da quantidade de células CD56<sup>+</sup> nas lesões LRE quando comparada às dos demais grupos (cerca de 3 vezes menos – quadro 2).

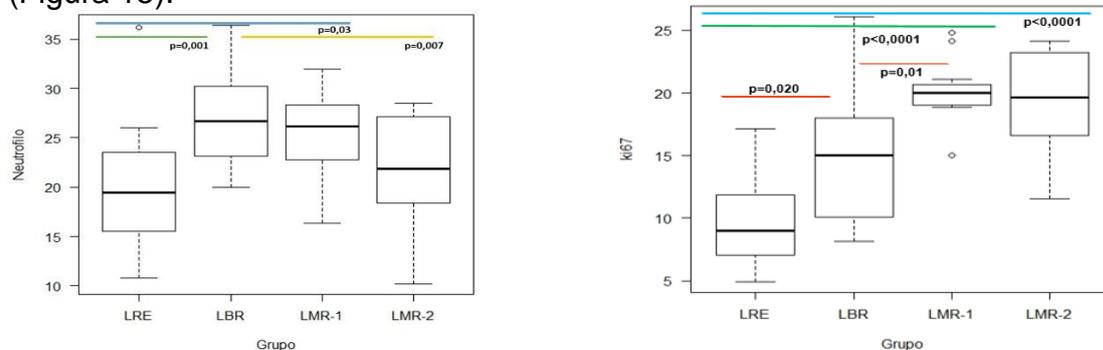
Os mastócitos eram distribuídos de maneira homogênea por toda a derme. De modo geral apresentavam-se em pequenas concentrações (em torno de 5 a 7%), se comparados às demais células avaliadas, e não foi demonstrada grande variação entre os grupos (figura 14). A comparação de todos os grupos identificou uma quantidade pequena de células com significância estatística no nível de  $p=0,05$ . Quando os grupos foram analisados separadamente dois a dois notou-se que essa tendência era principalmente devida à maior concentração nos grupos com boa resolução da infecção, seja por cura espontânea ou por boa resposta ao tratamento. Nota-se uma tendência a menores concentrações de mastócitos nos pacientes com má resposta ao tratamento, quer nas lesões primárias (LMR-1), quer nas lesões no momento da recidiva (LMR-2) (quadro 2).



**Figura 14-** Distribuição do percentual de células NK e mastócitos nas lesões dos grupos estudados. Análise estatística realizada por Kruskal Wallis com correção de Bonferroni.

Os neutrófilos estavam presentes em todas as lesões não importando o grupo de estudo ou as características clínicas de tempo de evolução e número de lesões. Eram visualizados em distribuição heterogênea com áreas de maior e menor concentração distribuídas por todo o tecido. Apesar de serem detectados valores medianos semelhantes era possível identificar variações nos grupos, sendo que o grupo LRE aquele que apresentava as menores concentrações. Isto pode ser demonstrado por uma diferença significativa na distribuição quando todos os grupos eram comparados (quadro 3) e também nas análises de grupos dois a dois (quadros 4 e 5 e figura 15). Assim, foi identificada diferença nas concentrações de neutrófilos no grupo LRE quando comparado com LMR-1 ( $p=0,03$ ) e LBR ( $p=0,001$ ). Os demais grupos eram semelhantes, com exceção de LBR em relação a LMR-2 ( $p=0,007$ ) (Figura 15).

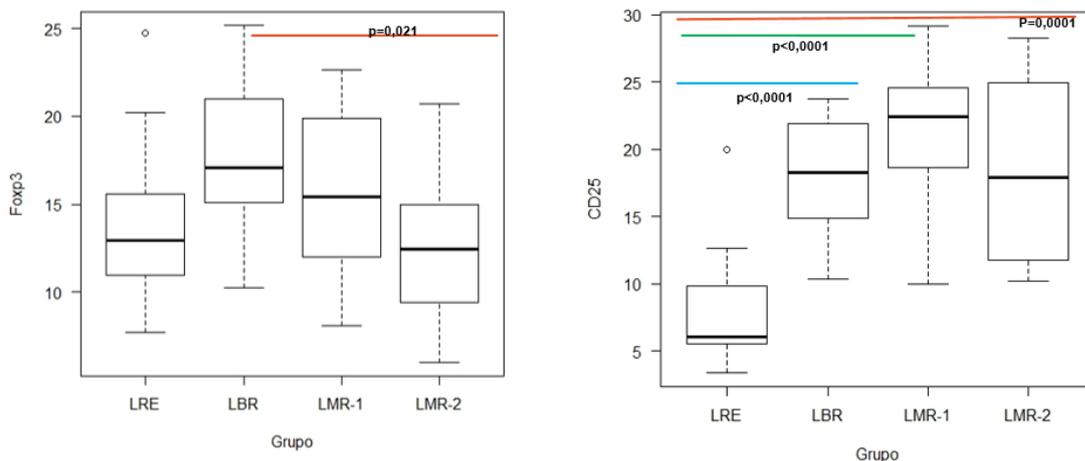
O marcador Ki67 identifica células em estágios de proliferação celular e pode ser observado em todas as lesões, com variação entre os grupos. Verifica-se no quadro 2, que os pacientes de LRE eram aqueles que apresentavam as menores concentrações de células em proliferação se comparados com os demais grupos. Este dado pode ser evidenciado quando todos os grupos foram analisados em conjunto ( $p<0,0001$  – quadro 3) e também quando LRE era comparado isoladamente com os outros grupos (com LBR  $p=0,020$ ; com LMR-1 e LMR-2  $p<0,0001$ ) (quadro 4 e 5 e figura 15). Já nos pacientes com má resposta ao tratamento, tanto as lesões primárias (LRM-1) quanto as de recidiva (LMR-2) eram aquelas que apresentavam as maiores concentrações de células positivas e isso pode ser observado quando este grupo foi comparado com os pacientes de boa resposta terapêutica (LBR x LMR-1  $p=0,01$ ) (Figura 15).



**Figura 15** Distribuição do percentual de neutrófilos e Ki67 nas lesões dos grupos estudados. Análise estatística realizada por Kruskal Wallis com correção de Bonferroni.

A molécula Foxp3 está ligada aos fenômenos regulatórios da resposta imune, principalmente quando coexpressa com o marcador CD25. Nos tecidos estudados, Foxp3 era heterogeneamente distribuído e a mediana de sua concentração variou de 12,56% (LMR-2) a 17,70% (LBR), respectivamente os grupos com menor e maior concentração (quadro 2). Devido a estas diferenças os grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando comparados no conjunto ( $p=0,027$  – quadro 3). Neste contexto, as comparações dois a dois demonstraram diferenças quando LBR foi comparado a LMR-2 ( $p=0,021$ ) (Figura 16).

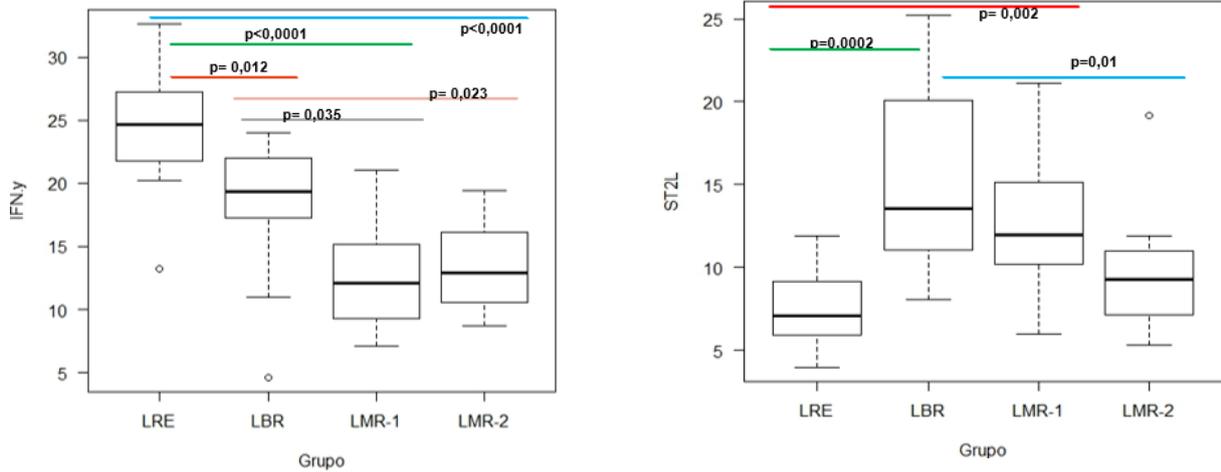
A molécula CD25 é parte do receptor de IL-2 e tanto pode estar associada a proliferação celular quanto ao fenômeno de regulação imune, neste caso quando associada a Foxp3. O percentual de células positivas para CD25 variou de forma importante entre os grupos sendo que o grupo LRE foi o que apresentou as menores concentrações de células positivas (mediana de 6,07%). Os demais grupos mostraram medianas semelhantes e cerca de 3 vezes superiores às verificadas para LRE (quadro 2). Neste sentido, observamos diferenças estatísticas apenas quando LRE era comparada com os demais grupos (para todas as comparações  $p<0,0001$ ) (quadros 4 e 5 e Figura 16).



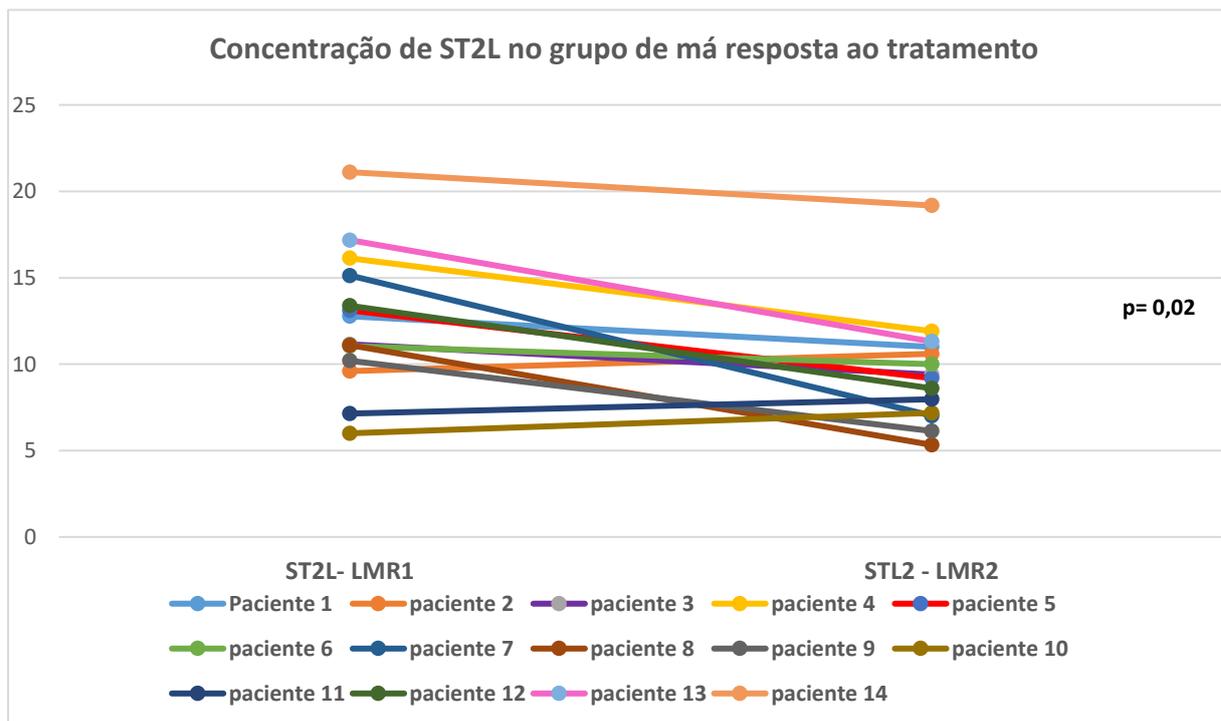
**Figura 16-** Distribuição do percentual de Foxp3 e CD25 nas lesões dos grupos estudados. Análise estatística realizada por Kruskal Wallis com correção de Bonferroni.

A expressão de IFN- $\gamma$  estava presente em todos os pacientes avaliados com variação entre os grupos e entre pacientes de um mesmo grupo (quadro 2). Apesar da heterogeneidade, foi possível identificar uma diferença quando os grupos foram comparados em conjunto ( $p < 0,0001$  – quadro 3). Esta diferença era devida principalmente a maior concentração de células positivas no grupo LRE, que era cerca de 6% maior que nos casos LBR e que girava em torno do dobro do observado nos grupos LMR (quadro 2). Foi também possível observar que os pacientes de má resposta se mostravam bastante semelhantes, não importando se LMR-1 ou LMR-2, e com número de células positivas para IFN- $\gamma$  menor que as identificadas nos pacientes de boa resposta terapêutica, cuja concentração de células positivas situava-se mais próximo dos casos de LRE (quadro 2). Neste contexto, quando os grupos foram comparados dois a dois, verificou-se diferença significativa entre LRE e LMR-1 ( $p < 0,0001$ ), entre LRE e LMR-2 ( $p < 0,0001$ ), entre LRE e LBR ( $p = 0,012$ ) e entre LBR e LMR-2 ( $p = 0,023$ ) (quadros 4 e 5 e Figura 17).

ST2L é uma molécula que identifica o receptor de IL-33, citocina ligada aos fenômenos de regulação da resposta imune. As análises das concentrações de células positivas para ST2L demonstrou diferenças significantes quando os grupos foram comparados em conjunto (quadros 2 e 3). Estes resultados foram obtidos devido a diferenças observadas sendo que o grupo LRE e LBR foram os que apresentaram respectivamente os menores e os maiores percentuais de células positivas (quadro 2). Devido a variação entre os grupos, a comparação dois a dois evidenciou diferenças entre LRE x LMR-1 ( $p = 0,002$ ), LRE x LBR ( $p = 0,0002$ ), assim como entre LBR x LMR-2 ( $p = 0,01$ ) (Figura 17). Como a molécula ST2L foi o único marcador a mostrar diferença estatística entre os pacientes LMR, foi avaliada a evolução da expressão de ST2L num mesmo paciente nos dois momentos (figura 18). Verificou-se uma diferença significativa ( $p = 0,02$ ) entre LMR1 e LMR2, com menor concentração de células positivas em LMR-2) (quadro 2 e figura 18) .



**Figura 17-** Distribuição do percentual de IFN-y e ST2L nas lesões dos grupos estudados. Análise estatística realizada por Kruskal Wallis com correção de Bonferroni.



**Figura 18-** Concentração de ST2L no grupo de má resposta ao tratamento durante a lesão primária (LMR-1) e durante a recidiva (LMR-2). Análise estatística pelo Teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

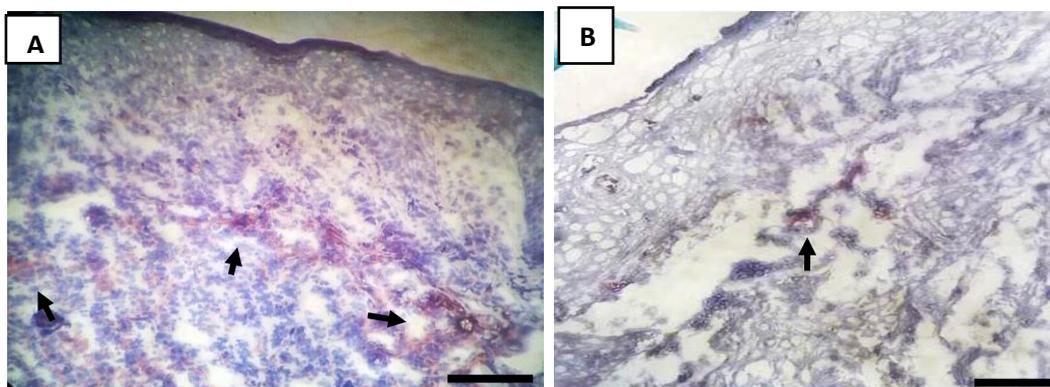
### 5.2.2.2 NOS2, presença de NETs e *Leishmania* spp

A distribuição por sítio positivo para a presença da enzima NOS2 está demonstrada na tabela 4. Para efeito de comparação a intensidade foi dividida pelo número de sítios positivos em um único campo como já descrito por Morgado et al (2008). Foi identificado um p-valor significativo de 0,004 durante a comparação dos grupos. As maiores intensidades de NOS2 foram observadas no grupo de resolução espontânea (LRE -Figura 19 A), enquanto as menores se encontravam nos grupos LMR1 e LMR2 (LMR-2 -Figura 19 B).

**Tabela 5-** Expressão de NOS2 nos diferentes grupos estudados

Intensidade	Grupo (Número de pacientes marcados - %)				*p-valor
	LMR-1	LMR-2	LBR	LRE	
1+	7 (50%)	8 (57%)	1 (7%)	0	
2+	4 (28%)	3 (21%)	3 (21%)	3 (21%)	<b>0.004</b>
3+	2 (14 %)	2 (14%)	6 (43%)	4 (28%)	
4 ou mais	1 (7%)	1 (7%)	4 (28%)	7 (50%)	

**LMR-1:** Leishmaniose Má Resposta Primária; **LMR-2:** Leishmaniose Má Resposta Recidiva; **LBR:** Leishmaniose Boa Resposta; **LRE:** Leishmaniose Resolução Espontânea \* p-valor calculado por Teste Exato de Fisher



**Figura 19-** Imunohistoquímica em lesões de LTA. Expressão de NOS2. Setas indicam maior expressão de NOS2 em LRE (A) e menor expressão em LMR2 (B). Barra: 40 µm

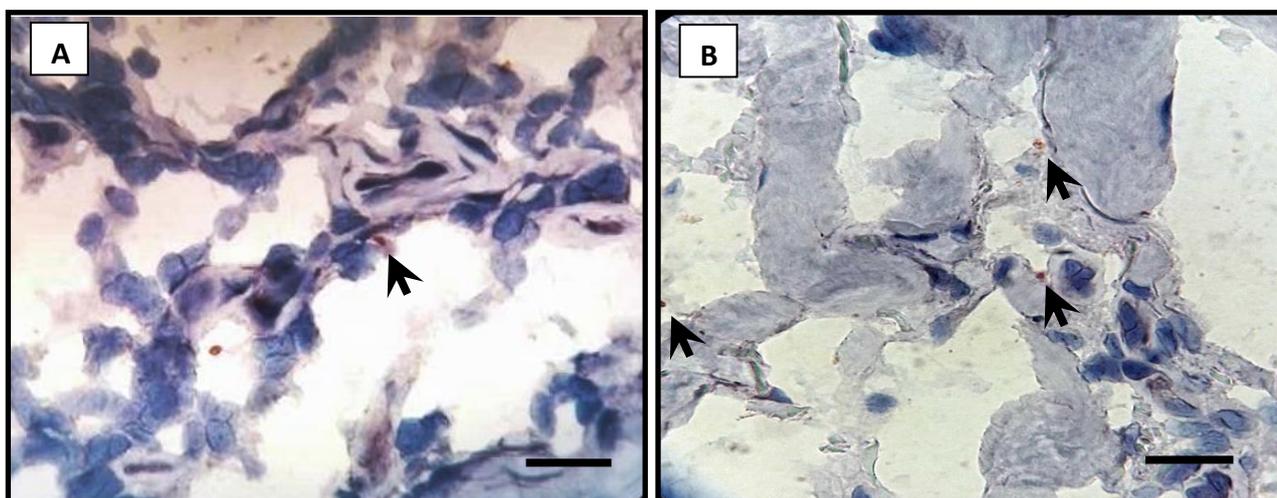
Já em relação a presença de parasitas (tabela 5) observamos que o grupo LMR apresentou um maior número de leishmânias em relação aos demais, apesar de não ter sido identificada diferença estatística.

**Tabela 6-** Contagem de *Leishmania* spp e NETs por mm<sup>2</sup>

Grupos	<i>Leishmania</i> spp (mm <sup>2</sup> ) (Mediana) (Min-máx)	p-valor	Nets (mm <sup>2</sup> ) (Mediana) (Min-Máx)	p-valor
LMR-1	0,23 (0 - 0,35)	0.362	0,13 (0-0,26)	0.339
LMR-2	0,12 (0 – 0,61)		0,08 (0-0,62)	
LBR	0,10 (0-0,40)		0,32 (0- 2,37)	
LRE	0,08 (0-0,28)		0,24 (0- 1,03)	

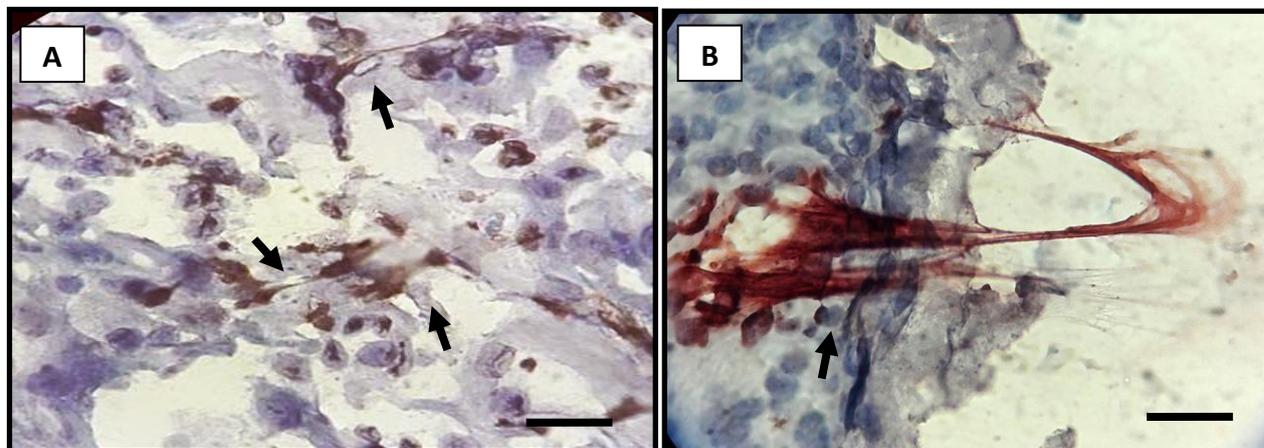
LMR-1: Leishmaniose Má Resposta Primária; LMR-2: Leishmaniose Má Resposta insucesso terapêutico; LBR: Leishmaniose Boa Resposta; LRE: Leishmaniose Resolução Espontânea  
p-valor calculado por teste de Kruskal-Wallis

A figura 20 demonstra a presença de parasitas no grupo LBR (A) e LMR-2 (B).



**Figura 20** – Detecção de amastigotas em lesões de LTA pela técnica de Imunohistoquímica. A) Setas indicam a presença de parasitas em lesões de LBR e B) no grupo LMR-2. Barra: 10 µm

A análise de NETs também não identificou diferenças estatísticas entre os grupos (tabela 5), entretanto no grupo LBR, as NETs (figura 21 e tabela 5) geralmente se apresentavam em maior dimensão e em maior quantidade do que no grupo LMR.



**Figura 21** – Detecção de NETs em lesões de LTA pela técnica de Imunohistoquímica. (A) e (B) lesões de LBR. As setas indicam a presença de NETs evidenciadas pela cor vermelha-acastanhada Barra: 10 µm

### 5.2.2.3 RESUMO DOS RESULTADOS COMPARATIVOS OBTIDOS ENTRE OS 4 GRUPOS DE ESTUDO

As principais comparações entre os 4 grupos estudados estão demonstradas no quadro 6.

Marcador	LRE	LBR	LMR
CD4/ CD8	CD4 > CD8	CD4 > CD8	CD8 ≥ CD4
CD22	+	++	++
NEU	+	++	++
NK	+	++	+++
MACRÓFAGO	+	++	+++
NOS2	+++	++	+
CD25	+	+++	+++
IFN-γ	+++	++	+
Ki67	+	++	+++
ST2L	+	++	++ / +++
	-Resposta tipo 1 - Equilibrada	-Maior celularidade -Equilibrada	-Desequilíbrio

**Quadro 6-** Comparação dos resultados de imunohistoquímica entre os grupos estudados

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela comparação de pacientes apresentando diferentes tipos de evolução para cura na LTA mostraram algumas semelhanças e diferenças que podem sugerir graus variados de carga parasitária e modulação da resposta imune *in situ*. De modo geral, clinicamente os pacientes apresentaram lesões semelhantes, apenas com maior número delas nos casos que evoluíram com má resposta ao tratamento. Além disto, quando os resultados de exames usados para a detecção de parasitas nas lesões foram obtidos, ficou também evidente que, pacientes que apresentaram má resposta terapêutica tinham maior facilidade de encontro de parasitas, já que a maior parte deles apresentou 2 ou 3 exames positivos, enquanto que nos casos de resolução espontânea todos os pacientes apresentaram apenas um exame positivo, e em muitos deles este exame foi a PCR. A relação da presença de maior número de lesões e a dificuldade de cura das lesões já foi descrita na literatura (RODRIGUES et al, 2006; SANTOS et al., 2008).

A literatura também tem relacionado casos de má resposta ao tratamento com outras características como idade, sexo, peso, comorbidades etc (COLMENARES et al., 2002). No entanto, nos pacientes avaliados por nós estes fatores mostraram-se semelhantes nos quatro grupos estudados.

Os pacientes com resolução espontânea precoce não foram tratados pois apresentaram sinais evidentes de cicatrização das lesões durante o período de investigação até o diagnóstico. A resolução espontânea das lesões tem sido descrita na literatura como de aparecimento eventual e é discutido se estes pacientes devem ou não receber tratamento específico, principalmente nos casos de infecção pela *L. braziliensis* (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2017). No Rio de Janeiro a taxa de resolução espontânea dos casos atendidos no ambulatório do VigiLeish-INI-Fiocruz foi calculada em cerca de 2,9% (OLIVEIRA- RIBEIRO et al, 2017), o que é compatível com a taxa de resolução espontânea descrita para LTA por *L. braziliensis*. O grupo por nós avaliado não foi tratado e tem sido acompanhado longitudinalmente e até o momento, após o diagnóstico, nenhum deles apresentou reaparecimento de lesão cutânea ou surgimento de lesão mucosa (VigiLeish, comunicação pessoal).

A classificação de falha terapêutica pode ser variada, de acordo com os critérios adotados pelos grupos de pesquisa. Segundo o Ministério da Saúde brasileiro, considera-

se falha terapêutica a ausência de resolução ou a recidiva das lesões após dois ciclos de tratamento convencional com antimoniato de meglumina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). No ambulatório do INI- Fiocruz tradicionalmente os pacientes são tratados com metade da dose convencional e os dados de boa resposta terapêutica são semelhantes ou até melhores do que os relatados em outros centros de atendimento ao paciente com LTA (SCHUBACH e CONCEIÇÃO-SILVA, 2014; RODRIGUES et al. BRAHIM et al., 2017). Essas diferenças podem ser devidas a características particulares dos pacientes da região ou dos parasitas circulantes (AZEREDO COUTINHO et al., 2014, BAPTISTA et al, 2009). Dados gerais de falha terapêutica com antimoniato de meglumina na dose de 10-20 mg Sb<sup>5+</sup>/kg/dia demonstram valores que variam de 46 a 75 % (ANTONIO et al., 2014). Devido a estas características, o ambulatório do INI Fiocruz convencionou classificar como insucesso terapêutico os casos com ausência de resolução e/ou recidiva de lesões em até 3 meses após um ciclo de antimoniato de meglumina na dose de 5mg Sb<sup>5+</sup>/kg/dia. Este foi o critério adotado para a classificação do grupo de pacientes com má resposta ao tratamento avaliados no presente estudo. Mesmo assim, esses pacientes apresentaram diferenças quando comparados aos demais grupos estudados e dos 14 casos acompanhados apenas a metade apresentou cura clínica após um segundo tratamento. A outra metade necessitou de três ou quatro tratamentos, inclusive com mudança do fármaco utilizado para a evolução das lesões para a cura. Estes dados têm relação com outros apresentados na literatura que indicam a frequente necessidade de mudança no medicamento de escolha para a obtenção de regressão e cura das lesões (SCHUBACH e CONCEIÇÃO-SILVA, 2014). O Ministério da Saúde preconiza uma sequência de fármacos de primeira e segunda escolha para tais casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Apesar da evolução inicialmente desfavorável, esses pacientes mantem-se curados, sem sinal de recidiva das lesões cutâneas ou aparecimento de lesões mucosas, em tempos variáveis de acompanhamento, nunca inferior a dois anos.

Devido a impossibilidade de quantificação de parasitas na lesão durante o presente estudo, apesar de não ser possível afirmar que os pacientes com má resposta ao tratamento apresentavam carga parasitária superior aos demais grupos, chama a atenção a facilidade de obtenção de resultados positivos para a presença de parasitas quando diferentes métodos como impressão em lâmina, histopatologia, e cultivo eram empregados. Por outro lado, esta avaliação também demonstrou uma tendência a dificuldade de

comprovação do parasita nos casos de resolução espontânea. Esta tendência poderia sugerir que a quantidade de parasitas nas lesões poderia influenciar o controle da infecção e conseqüentemente a resposta ao tratamento. A literatura não aborda este tópico frequentemente mas alguns estudos divergentes tem demonstrado tanto uma similaridade (PEREIRA et al, 2015) quanto a possibilidade de diferenças na quantidade de parasitas nas lesões podendo influenciar a evolução da infecção (BRETSCHER et al., 1992; MENON e BRETSCHER, 1996). Neste contexto, a persistência parasitária em lesões clinicamente curadas é hoje plenamente aceita (SCHUBACH *et al.*, 1998b; MORGADO *et al.*, 2010) e artigo do nosso grupo (MORGADO et al, 2010) e de outros grupos (STENGER et al., 1996) demonstraram que existe um equilíbrio de resposta imune e replicação parasitaria, que uma vez perdido pode levar a reativação das lesões, como descrito em casos de pacientes com HIV-Aids e doenças autoimunes em tratamento imunossupressor (VIROT et al., 2017; LINDOSO et al., 2009). Por outro lado, Belkaid e cols (2000) avaliando a evolução de lesões cutâneas no modelo murinho de infecção pela *L. major*, demonstraram que a ulceração coincide com o momento em que a resposta imune começa a se tornar evidente e a carga parasitária diminui, sugerindo que a resposta imune seria a responsável pelo surgimento das úlceras na leishmaniose cutânea.

As lesões ativas de LTA têm sido avaliadas *in situ* por inúmeros autores (CONCEIÇÃO-SILVA et al., 2013; PALMEIRO et al., 2012; MORGADO et al., 2008; LEMOS et al., 2010). Populações celulares relevantes para a resposta imune como linfócitos T, macrófagos e neutrófilos são implicadas como de grande importância tanto para a manutenção de lesões ulceradas, quanto para o controle da carga parasitária e instalação dos fenômenos de cicatrização (JOHN & HUNTER, 2008; MORGADO et al., 2010). Amato e cols (2003) demonstram em lesões mucosas que a persistência parasitária pode estar relacionada à manutenção da resposta inflamatória local; além disto, outros estudos também já demonstraram parasitas em cicatrizes de pacientes de LTA (SCHUBACH et al., 1998; MENDONÇA et al., 2004). Morgado e cols (2010) observaram uma grande concentração de macrófagos em meio ao tecido fibrótico de cicatrizes, que poderia estar indicando áreas com atividade inflamatória. Os autores sugerem ainda que a exacerbação da atividade inflamatória residual poderia levar a reativação após a cura clínica.

Nos últimos anos, além dos macrófagos e neutrófilos, outras células como células NK e mastócitos têm sido implicadas no fenômeno de instalação da resposta imune e controle de carga parasitaria (NAQVI et al., 2017; SCHARTON e SCOTT, 1993). Assim, torna-se importante avaliar os componentes da resposta imune no processo inflamatório que ocorre nas lesões de pacientes com diferentes apresentações clínicas e evoluções para a cura na LTA. No presente trabalho avaliamos três grupos de pacientes com diferentes evoluções diferentes para cura: resolução espontânea precoce, boa resposta ao tratamento antimonial e má resposta ao tratamento antimonial. Neste último, tivemos ainda a oportunidade de verificar as lesões de um mesmo paciente no momento do diagnóstico confirmatório de LTA e também no momento em que as lesões apresentavam indícios de reativação, após o primeiro ciclo de tratamento específico. A comparação de alguns marcadores celulares e funcionais indicou características da resposta inflamatória nestes grupos que puderam auxiliar a identificar diferenças relevantes entre eles.

De um modo geral, os pacientes com resolução espontânea precoce e aqueles com boa resposta ao tratamento eram os que apresentavam a resposta imune mais equilibrada, como predominância de células CD4<sup>+</sup> e presença de IFN- $\gamma$  em maior concentração que nos pacientes com má resposta ao tratamento. Ainda é interessante notar que, se comparamos os casos de resolução espontânea precoce com os pacientes que necessitaram de tratamento mas obtiveram cura (boa resposta) podemos notar que nos casos de cura espontânea, sinais de atividade como presença de marcador de receptor para IL-2 (CD25), células em proliferação (Ki67<sup>+</sup>), neutrófilos, células NK, macrófagos e células CD8<sup>+</sup> mostravam-se em concentrações inferiores, sugerindo que o processo inflamatório estava mais controlado e isto inclusive poderia ser mais uma sugestão indireta da presença de menor número de parasitas. Muitas destas células têm envolvimento no controle da carga parasitaria e nos processos de citotoxicidade que por sua vez podem gerar lesão tecidual, quando exacerbados. Estas células também têm geralmente ligação com a presença de parasitas e a necessidade de eliminação dos mesmos como já descrito em modelos murinos (LIEW et al., 1990; CHAGAS et al., 2014; LAURENTI et al., 1999) e em avaliações realizadas em pacientes (MORGADO et al., 2015, MORGADO et al., 2008). A importância da resposta tipo 1, caracterizada por citotoxicidade, concentrações ótimas de IFN- $\gamma$  e linfócitos, além de macrófagos ativados ao estágio parasiticida, é apontada como determinante para o controle da infecção (MENDONÇA et al., 1986; CONCEIÇÃO-SILVA

*et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012). Mas também é indicado que, uma vez controlada a carga parasitaria, a intensidade da resposta imune precisa ser modulada para que o tecido inicie o processo de reparação tecidual e cicatrização (MORGADO *et al.*, 2010). Assim, nos parece lógico que casos com evolução para a cicatrização espontânea apresentem resposta imune com tendência a menor intensidade do fenômeno inflamatório que os casos que necessitaram de tratamento. Neste sentido, a diferença encontrada nas concentrações de células NK nos pacientes de resolução espontânea em comparação aos pacientes dos outros grupos parece corroborar esta sugestão.

Células *Natural Killer* são linfócitos granulares derivados da medula óssea que recentemente foram classificadas como pertencentes ao grupo das células linfóides inatas (PRADO DIETZ e LUONG, 2016; ZHANG e HUANG, 2017; ROBINETTE e COLONNA, 2016). São reconhecidas por sua importante função na vigilância de tumores e na resposta às infecções virais, mas também têm sido descritas como tendo papel importante na iniciação da defesa dos hospedeiros a outros patógenos intracelulares, com ação sobre macrófagos através da produção de IFN- $\gamma$ . A presença de células NK foi detectada no infiltrado inflamatório de todos os pacientes avaliados. No entanto era patente a menor concentração (cerca de 3 vezes menos) destas células nos casos de regressão espontânea precoce. Por outro lado, nossos resultados demonstraram uma semelhança nas lesões dos pacientes que necessitaram de tratamento, sendo que os pacientes com boa resposta terapêutico apresentavam menores concentrações celulares em suas lesões que as observadas nas lesões primárias dos casos de má resposta. Esses resultados podem sugerir que devido ao melhor controle da inflamação a atividade NK não esteja mais sendo necessária. Neste sentido foi descrito que células NK de indivíduos sadios eram ativadas pela presença *in vitro* de *L. aethiopica* (AKUFFO, MAASHO e HOWE, 1993). E que estas células seriam as responsáveis pela produção de IFN-  $\gamma$  que, ao dirigir a diferenciação de células CD4<sup>+</sup> para o fenótipo tipo 1 poderiam participar do controle precoce da infecção promovendo resistência (SCHARTON e SCOTT, 1993, LASKAY, ROLLINGHOFF e SOLBACH, 1993). Mais estudos sobre o papel de células NK precisam ser realizados para a confirmação de sua atuação no controle da infecção. Infelizmente, estes fenômenos podem ser bastante precoces no curso da infecção, dificultando sua identificação na avaliação de pacientes.

Em comparação com os casos de resolução espontânea precoce, os pacientes que necessitaram de tratamento específico, mostravam maior similaridade de resposta imune *in situ*, independente de serem bons ou maus respondedores ao tratamento. Mesmo assim, algumas características particulares do infiltrado inflamatório puderam ser observadas. Pacientes com boa resposta ao tratamento apresentavam maior concentração de células CD4<sup>+</sup> e de áreas positivas para IFN- $\gamma$  que as lesões tanto iniciais quanto reativadas dos pacientes com má resposta ao tratamento. A importância de CD4 como célula ativadora de resposta imune, com características de resposta tipo 1, quando na presença de IFN- $\gamma$  levando a ativação de macrófagos a estágios parasiticidas é comprovada na leishmaniose cutânea (KIMA e SOONG, 2013). Nossos resultados também evidenciaram que a expressão da enzima NOS2 era mais intensa nos casos de boa resposta que nos pacientes que não se curaram após o primeiro tratamento. Isto tem sido verificado tanto no modelo murino (WEI et al., 1995; MURRAY e NATHAN, 1999; BOGDAN et al, 2000) quanto em pacientes com lesões ativas (QADOUMI et al., 2002; PALMEIRO, 2012). A presença de óxido nítrico, produzido a partir da ação da enzima NOS2 no substrato L- arginina, é considerada fator determinante para o controle da carga parasitária por macrófagos, que podem assim atuar como parasiticidas eliminando as formas amastigotas (BOGDAN e RÖLLINGHOFF, 1998). Este dado torna-se mais relevante no sentido de que nos pacientes com má resposta ao tratamento foi verificada a maior concentração de macrófagos em relação aos demais grupos, mas também foram aqueles em que a presença de NOS2 era mais fraca. Indiretamente, estes dados indicam que os macrófagos presentes nas lesões destes pacientes não estavam plenamente ativados e assim, teriam dificuldade de eliminação dos parasitas. A necessidade de ativação de macrófagos para eliminação de leishmânias tem sido demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo* em diferentes modelos de infecção (SARAH, SAMRA e NUWAYRI-SALTI, 1975; PODINOVSKAIA e DESCOTEAUX, 2015) e a incapacidade destas células eliminar a infecção é apontada como um dos fatores envolvidos na evolução clínica dos casos de leishmaniose cutânea difusa (LCD). Nestes casos, os pacientes apresentam defeito de resposta imune, sendo incapazes de montar resposta do tipo 1, não ocorrendo controle da infecção, levando a cronicidade da lesão e incapacidade de responder ao tratamento (BARRAL et al., 1995; CONCEIÇÃO-SILVA, MORGADO e COUTINHO, 2014).

Este mesmo raciocínio pode ser considerado para a ação de neutrófilos. Nossos resultados demonstraram uma semelhança na infiltração de neutrófilos quando lesões de boa resposta e má resposta primária (LMR1) foram comparadas, e estes dois grupos apresentavam maiores concentrações desse tipo celular que os casos de resolução espontânea precoce. No entanto, quando a presença de NET foi avaliada, apesar de não haver diferença significativa, pode-se identificar uma tendência a maior concentração das redes de neutrófilos nos casos de boa resposta se comparados com os de má resposta. A importância de neutrófilos na inflamação presente nas lesões de LTA tem sido demonstrada, tanto para controle da carga parasitária (formação de NET) quanto para a facilitação da sobrevivência dos parasitas (cavalo de troia) (JOHN & HUNTER, 2008). Recentemente nosso grupo demonstrou que a formação de NET estava relacionada à presença de amastigotas extracelulares e que a eliminação do parasita cursava em concomitância com o desaparecimento da formação de redes neutrofílicas (MORGADO et al., 2015). Mais uma vez esses dados indiretamente sugerem que nos casos de má resposta existe uma dificuldade de ação sobre o parasita, quer seja por inadequação do tipo / intensidade da resposta imune, quer seja pela maior carga parasitária.

Além da resposta do tipo 1, fenômenos inflamatórios voltados para a regulação da resposta imune *in situ* são de grande importância para o equilíbrio entre a eliminação do parasita e a preservação do tecido. Neste sentido, todo processo inflamatório cursa com expressão de atividade pró inflamatória e de regulação. Linfócitos T reguladores (Treg) podem regular a resposta imune inata e adaptativa e tem a habilidade de controlar efeitos excessivos ou mal direcionados do sistema imune. Essa modulação envolve diferentes mecanismos como a supressão da proliferação de células T e produção de citocinas, a secreção de citocinas imunossupressoras e a indução de apoptose de células T em várias doenças, inclusive infecciosas (RODRIGUES et al., 2014). Treg também tem sido implicada na prevenção do desenvolvimento de auto imunidade e na manutenção da homeostase e tolerância a microbiota (O'CONNOR e ANDERTON, 2015). Nos últimos anos várias células e moléculas têm sido descritas como envolvidas na regulação imune. Entre elas podemos citar a molécula Foxp3, que juntamente com CD25 é expresso em Treg, a citocina IL-33 e seu receptor ST2L e mastócitos, que liberando grandes concentrações de citocinas do tipo 2 podem auxiliar no controle da inflamação. Nossos resultados demonstraram um percentual de células positivas para Foxp3 que variou de 12 a 17 % das células das lesões

com predominância em lesões de pacientes que necessitaram, mas responderam bem ao tratamento. Isso se mostrou mais evidente quando estes dados foram comparados com as lesões de reativação nos casos de má resposta. Rodriguez-Pinto e cols (2012) demonstraram que Tregs participariam da resolução de lesões dérmicas e que por isso mesmo ela poderia ser utilizada como marcador para estratégias imunoterápicas das leishmanioses causadas por espécies do subgênero *Vianna*. Neste contexto foi descrito que pacientes de área endêmica do Irã, apresentando teste de Montenegro positivo (assintomáticos) ou com lesões de leishmaniose curadas apresentavam quantidades similares de células CD4<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> no sangue periférico e sugerem que a modulação da resposta imune para manutenção da proteção contra reinfecções poderia ter a participação de fenômenos regulatórios (BAHRAMI et al., 2014). Por outro lado, Rodrigues e cols (2014) indicam que as lesões causadas por *Leishmania braziliensis* consistentemente apresentam menor densidade de Foxp3 que lesões causadas por outras espécies do subgênero *Viannia*, e sugerem que a espécie do parasita pode influenciar o estímulo da regulação da resposta imune. Todos os nossos pacientes são residentes da área endêmica do Rio de Janeiro onde a *Leishmania braziliensis* é considerada a espécie predominante, senão única (OLIVEIRA- NETO et al., 1988; AZEREDO-COUTINHO e al, 2007). Neste caso as comparações por nós realizadas demonstram uma diferença provavelmente relacionada a resposta do paciente. Outras moléculas também podem ser implicadas como marcadores de regulação, uma delas a galectina-3 tem sido considerada como reguladora da frequência e função da Treg e que a expressão desta molécula poderia alterar o curso da infecção por *L. major* (FERMINO et al., 2013). A avaliação de outros marcadores dos fenômenos de regulação da resposta imune pode auxiliar na melhor compreensão da resposta imune na LTA.

A molécula ST2L é um receptor ancorado à membrana capaz de se ligar a IL33, e uma vez ativado por esta citocina se transforma em uma molécula solúvel (sST2) com propriedades anti-inflamatórias (DE LA FUENTE, MACDONALD e HERMOSO, 2015). A IL-33 é uma citocina pertencente à família IL-1, que tem sido relacionada a patogênese de doenças atópicas (asma) ou autoimunes (artrite reumatoide, doença inflamatória da bexiga), câncer e de desordens do sistema nervoso central (doença de Alzheimer). IL33 é comumente associada a estimulação de células T do tipo 2 (KROPF et al., 1999). Outras células podem ser influenciadas por IL33, principalmente células B, célula dendríticas,

macrófagos, mastócitos e células linfoides da resposta imune inata (LU et al., 2015). A estimulação de IL33 parece ser crucial para a polarização da resposta do tipo 2 e indução de Treg (LU et al., 2015; HARDMAN e OGG, 2016). A inibição de ST2L por anticorpos diminui o estímulo a resposta do tipo 2 em camundongos BALB/C infectados por *L major*, levando ao controle da infecção (LIEW, XU e CHAN, 1999). Khalid e cols (2017) demonstraram ainda que camundongos knockout para ST2 conseguiam um melhor controle da infecção por *Leishmania infantum*. Estes dados sugerem a ação de IL33/ ST2L na progressão da leishmaniose. No entanto, nossos resultados mostraram uma baixa concentração de células positivas para ST2L sendo que o grupo de boa resposta era o que apresentava o maior percentual e o de regressão espontânea o menor número de células positivas. A literatura a respeito da ST2L em relação à leishmaniose é escassa em avaliação de pacientes. Recentemente foram estudados casos de leishmaniose visceral nos quais foi sugerido que IL-33/ST2L pode ser considerado um marcador potencial de prognóstico para susceptibilidade à infecção (ROSTAN et al., 2013). Nossos resultados não permitem tal sugestão e outras avaliações deverão ser feitas para a compreensão do papel de IL33/ ST2L nas leishmanioses cutâneas.

Os mastócitos são geralmente encontrados ao redor de vasos e são implicados em fenômenos de vasodilatação. São descritos como participantes de processos fisiológicos e patológicos como a reação de hipersensibilidade imediata e doenças alérgicas (KRITAS et al., 2013). São produtores de IL4 e junto com a IL-33 foram implicadas na anafilaxia induzida por IgE (KRITAS et al., 2013; LU e HUANG, 2017). Ao lado de outros componentes do sistema imune foram apontados como envolvidos na eliminação de parasitas (LU e HUANG, 2017). No entanto ainda é obscuro se mastócitos promovem a defesa via efeitos diretos sobre células T ou modificando as funções das células apresentadoras de antígeno (DUDECK et al., 2011). Na leishmaniose, resultados divergentes têm sido descritos principalmente no modelo murino com autores indicando uma ação no aumento e na persistência das lesões em modelo animal (WERSHIL et al., 1994), assim como o estímulo a indução de resposta Th1 e Th17 (DUDECK et al., 2011) e outros autores demonstrando uma relação com células Th2 (PAUL et al., 2016), ou mesmo desempenhando papel de regulação na resposta imune por diminuir ou regular a resposta Th1, o que já foi sugerido por Oliveira et al. (2005). Paul e colaboradores (2016) demonstraram ainda no modelo murino que mastócitos não teriam impacto na gravidade da evolução da infecção por *L.*

*major*, sugerindo que outros tipos celulares deveriam ser considerados como estimuladores da resposta Th2 estimulada por IL4.

Nossos resultados demonstraram que o número de mastócitos era significativamente maior em casos de resolução espontânea e boa resposta ao tratamento, quando comparadas aos pacientes maus respondedores. Em leishmaniose visceral canina (LVC) já foi demonstrado que os mastócitos estão envolvidos no processo de remodelamento tecidual, favorecendo a cicatrização. Em conjunto esses resultados sugerem que uma ação modeladora de mastócitos pode facilitar a organização tecidual (DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2017). Neste sentido recentemente foi demonstrado no modelo murino e *in vitro* que mastócitos podem auxiliar na eliminação de leishmânias através da formação de redes extracelulares semelhantes aquelas produzidas por neutrófilos (NAQVI et al., 2017). Desta forma, sua maior concentração nas lesões com evolução benéfica poderia estar ligada à sua ação não apenas na regulação da resposta imune, mas também na remodelação tecidual e no controle da carga parasitária tecidual.

No conjunto nossos resultados demonstraram variações importantes na dinâmica do processo inflamatório nas lesões de leishmaniose com diferentes evoluções para cura clínica, e sugerem que os casos de regressão espontânea precoce são aqueles que a infecção e a resposta imune são melhor controladas, o que facilitaria o controle da carga parasitária e o estímulo aos fenômenos de reparação tecidual. É preciso lembrar que a persistência parasitária é fenômeno conhecido nas leishmanioses e que para a cura clínica das lesões não há necessidade de cura parasitológica (MORGADO et al., 2010). Desta forma, o parasita não precisa ser completamente eliminado para que as lesões regridam e os fenômenos de reparação levem à sua cicatrização. Este mesmo raciocínio pode ser sugerido para as lesões com boa resposta terapêutica em que o fenômeno inflamatório mostra maior atividade, mas ainda assim com um equilíbrio que pode permitir o controle da infecção. Já os casos de má resposta terapêutica, apesar de mostrarem similaridades com as lesões com evolução para boa resposta terapêutica, apresentam características que podem sugerir um certo desequilíbrio na resposta inflamatória com diminuição de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e da expressão de IFN- $\gamma$  aliadas a um aumento de células em proliferação e macrófagos, que em comparação com os outros grupos demonstram uma menor intensidade de expressão de NOS2. Este dado indiretamente sugere uma menor ativação

destas células ao estágio parasiticida. No entanto, outras avaliações precisariam ser feitas para verificar este ponto em particular.

A melhor compreensão da dinâmica do processo inflamatório ligada aos fenômenos de cura das lesões de LTA poderá trazer subsídios ao desenvolvimento de novos tratamentos, inclusive imunoterápicos e vacinais, para o melhor controle da infecção.

## 7. Conclusões

1- Com exceção do grupo LRE que apresentava 50% para cada sexo, nos demais grupos, os pacientes eram predominantemente do sexo masculino. Apesar de não haver diferença significativa, na maioria dos casos houve acometimento dos membros inferiores e lesões do tipo ulcerada. As maiores lesões em diâmetro e quantidade e o menor tempo de evolução foram encontrados no grupo de má resposta.

2- Notamos diferenças na positividade de exames diagnósticos como a histopatologia e a IDRM entre os grupos avaliados, sendo o grupo de má resposta o responsável por estes resultados, já que apresentava os achados mais frequentes de parasitas nos exames histopatológicos e a menor média de IDRM. Porém a simples realização desses dois exames, comumente usados no diagnóstico de LTA, neste estudo não foi suficiente para prever o desenvolvimento da evolução de LTA.

3- Foi interessante notar que, de um modo geral, os pacientes com má resposta apresentavam maior quantidade de exames parasitológicos positivos se comparados aos demais grupos, o que pode indiretamente sugerir que esses pacientes poderiam apresentar maior carga parasitária. No entanto outras avaliações devem ser feitas para confirmar esta sugestão.

4- O grupo LRE não fez uso de qualquer medicamento até a cicatrização das lesões. Na avaliação *in situ* demonstrou uma resposta imunológica mais controlada, com menores concentrações de CD22, CD25, NK, macrófagos, neutrófilos, ST2L e um pequeno percentual de proliferação celular, além de uma expressão mais intensa de NOS, IFN-  $\gamma$  e menos parasitas, sugerindo um maior equilíbrio da resposta inflamatória.

5- O grupo LBR fez uso apenas de um ciclo de antimoniato de meglumina e apresentou desfecho favorável após o fim do tratamento sem reativação das lesões. O infiltrado inflamatório *in situ* mostrou-se intermediário entre os casos de LRE e LMR, com características de maior atividade inflamatória que os casos de LRE, sem contudo, apresentar fenômenos evidentes de desequilíbrio para exacerbação ou deficiência de resposta que foram identificados em alguns marcadores inflamatórios em LMR. A resposta imune *in situ* apresentou concentração de macrófagos intermediária mas com bom índice de atividade da enzima NOS2, o que indiretamente indica a capacidade de ativação destas

células ao estágio parasiticida. Neste contexto apresentava ainda uma proporção mediana de células Ki67 (indicando proliferação), se comparado aos demais grupos. Estes dados apontam para uma atividade inflamatória importante, mas dentro de condições de equilíbrio.

**6-** Os pacientes LMR apresentaram pior resposta ao tratamento, necessitando de diferentes medicamentos para a cura total das lesões. A resposta imune mostrou semelhanças nas concentrações de marcadores inflamatórios entre os dois momentos das lesões de LMR (LMR-1 e LMR-2). Além disto, foi possível observar uma resposta imune menos intensa aliada ao maior número de exames parasitológicos positivos. Chamou a atenção o fato de estes pacientes serem aqueles com maior quantidade de macrófagos, aliado às mais baixas taxas de positividade para NOS2 e expressão de IFN- $\gamma$ , o que fala a favor de que muitos dos macrófagos não apresentavam ativação ao estágio parasiticida. Em conjunto esses resultados sugerem que os casos LMR apresentavam resposta imune menos eficaz com dificuldade de controlar a carga parasitária, levando à necessidade de tratamentos mais robustos para o controle da infecção.

**7-** Os marcadores celulares e funcionais da resposta imune avaliados no presente estudo apresentaram diferenças quando comparados entre os quatro grupos examinados (LRE, LBR, LMR-1 e LMR-2), sugerindo que a resposta imune estaria atuando de maneira diferente em cada um. Assim, nossos resultados apontam para diferenças na organização e intensidade do processo inflamatório nas lesões ativas de LTA, na dependência da qualidade/necessidade de tratamento. Outros marcadores poderão ser avaliados de modo a completar o painel de perfil de resposta imune nesses grupos.

## 6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular. Principais características das moléculas CD*. Editora Elsevier, 6ª edição, 2008.

ALVAR, J., VELEZ, I. D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J. Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7(5), e35671, 2012.

AKHOUNDI, M., DOWNING, T., VOTÝPKA, J., et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis, *Molecular Aspects of Medicine* (2017), doi: 10.1016/j.mam.2016.11.012.

AKUFFO, H.; MAASHO, K.; HOWE, R. Natural and acquired resistance to Leishmania: cellular activation by Leishmania aethiopica of mononuclear cells from unexposed individuals is through the stimulation of natural killer (NK) cells. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 94, n. 3, p. 516-521, 1993.

AMATO, V.S.; ANDRADE JR, H.F.; DUARTE, M.I.S. "Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment". *Acta Tropica* 85: 39-49, 2003.

AMATO, V.S.; RABELLO, A.; ROTONDO-SILVA, A.; KONO, A.; MALDONADO, T.P.; ALVES, I.C. *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.

AMEEN M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol* 2010;35:699–705, 2010.

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. São Paulo*,56(5): 375-80, 2014.

ARONSON, N.; HERWALDT, B.L.; LIBMAN, M.; et al. "Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH)". *Clin Infect Dis*. 2016 Dec 15;63(12):e202-e264, 2016.

AZEREDO-COUTINHO, R.B.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, A.O.; et al (2007). First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania*

*amazonensis* infection in Rio de Janeiro state, Brasil. Trans R Soc Trop Med Hyg, 101:735-737.

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

AWASTHI A, MATHUR, RK, SAHA B. Immune response to Leishmania infection. *Indian J Med Res* 119: 238-258, 2004.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO-DE-JESUS, A.; DUTRA, W.O. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 2002; 70 (12): 6734-40.

BACELLAR, O.; FARIA, D.; NASCIMENTO, M.; *et al.* Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2009;200:75-78.

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. *Exp Parasitol* 2009; 121:317-322.

BAPTISTA, C., MIRANDA, L. D. F. C., MADEIRA, M. D. F., LEON, L. L. P., CONCEIÇÃO-SILVA, F., & SCHUBACH, A. D. O. *In vitro* sensitivity of paired *Leishmania (viannia) braziliensis* samples isolated before meglumine antimoniate treatment and after treatment failure or reactivation of cutaneous leishmaniasis. *Disease markers*, 2015.

BARRAL, A., PEDRAL-SAMPAIO, D., GRIMALDI JR, G., *et al* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 44(5), 536-546, 1991.

BARRAL, A., COSTA, J. M., BITTENCOURT, A. L., BARRAL-NETTO, M., & CARVALHO, E. M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International journal of dermatology*, 34(7), 474-479, 1995.

BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A., BROODSKYN C, CARVALHO, E.M., REED, S.G. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1995,Jan;17(1):21-8.

BARRAL-NETO, M.; MACHADO, P.; BITTENCOURT A & BARRAL A. Recent advances in the pathophysiology and treatment of cutaneous leishmaniasis. *Curr. Opin. Dermatol.* 1997;4: 51-58.

BASANO, S. D. A., & CAMARGO, L. M. A.. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Revista brasileira de epidemiologia*, 7(3), 328-337, 2004

BELKAID, Y., MENDEZ, S., LIRA, R., KADAMBI, N., MILON, G., & SACKS, D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *The Journal of Immunology*, 165(2), 969-977, 2000.

BERMAN, J.J. Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. *Expert Opinion On Drug Metabolism and Toxicology*, 4 (9): 1.209-1.216, 2008

BEZERRA, J. L., COSTA, G. C., LOPES, T. C., CARVALHO, I. C., PATRÍCIO, F. J., SOUSA, S. M., et al. Evaluation of the in vitro leishmanicidal activity of medicinal plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 631-637, 2006.

BLUM, J., DESJEUX, P., SCHWARTZ, E., BECK, B., HATZ, C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travelers. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:158-66

BITTENCOURT, A.L., COSTA, J.M., CARVALHO, E.M., BARRAL, A. Leishmaniasis recidiva cutis in American cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 1993; 32: 802– 805

BOGDAN, C., & RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International journal for parasitology*, 28(1), 121-134, 1998.

BORGES, V. C., RUIZ, M. C. M., GOMES, P. M., COLOMBO, A. R., SILVA, L. D. A., ROMERO, et al. Intradermorreação de Montenegro após sucessivas repetições do teste em Porteirinha, MG. *Rev Soc Bras Med Trop*, 36(2), 249-251, 2003.

BAHRAMI, F., DARABI, H., RIAZI-RAD, F., KHAZE, V., AJDARY, S., & ALIMOHAMMADIAN, M. H. FOXP3 expression and frequency of regulatory T cells in healed individuals from *Leishmania major* infection and the asymptomatic cases. *Human immunology*, 75(10), 1026-1033, 2014

BRAHIM, L. R., VALETE-ROSALINO, C. M., ANTÔNIO, L. D. F., PIMENTEL, M. I. F., LYRA, M. R., PAES, L. E. D. C., et al. Low dose systemic or intralesional meglumine antimoniate treatment for American tegumentary leishmaniasis results in low lethality, low incidence of relapse, and low late mucosal involvement in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil (2001-2013). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(12), 838-843, 2017

BRETSCHER, P. A., WEI, G., MENON, J. N., & BIELEFELDT-OHMANN, H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science*, 257(5069), 539-542, 1992.

BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M., & DIFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological Reviews*, 173: 17-26, 2000.

CALVOPINA, M; UEZATO, H; GÓMEZ, EA; et al (2006). "Leishmaniasis recidiva cutis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in subtropical Ecuador: isoenzymatic characterization". *Int. J. Dermatol.* 45: 116-120.

CHAGAS, A. C., OLIVEIRA, F., DEBRABANT, A., VALENZUELA, J. G., RIBEIRO, J. M., & CALVO, E. Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases *Leishmania* parasite survival in neutrophils and inhibits X11a contact activation in human plasma. *PLoS pathogens*, 10(2), e1003923, 2014

BAPTISTA, C., MIRANDA, L. D. F. C., MADEIRA, M. D. F., LEON, L. L. P., CONCEIÇÃO-SILVA, F., & SCHUBACH, A. D. O. In vitro sensitivity of paired *Leishmania (viannia) braziliensis* samples isolated before meglumine antimoniate treatment and after treatment failure or reactivation of cutaneous leishmaniasis. *Disease markers*, 2015.

COLMENARES, M., KAR, S., GOLDSMITH-PESTANA, K., & MCMAHON-PRATT, D. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, S3-S7, 2002.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F.N.; DA COSTA-SANTOS, M.; MIRANDA-NASCIMENTO, C.; SCHUBACH, A.O. *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., PIMENTEL, M. I. F., E VASCONCELLOS, E. D. C. F., SCHUBACH, A. O., VALETE-ROSALINO, C. M., et al. Two women presenting worsening cutaneous ulcers during pregnancy: diagnosis, immune response, and follow-up. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(12), e2472, 2013.

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. 358-388

COTA, G.F., SOUSA, M.R., FERRETTI, T.O, SALEME, O.S., ALVARISA, T.K, RABELLO, A. The cure rate after placebo or no therapy in American cutaneous leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016;11(2):1–15

DA-CRUZ, A.M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; BERTHO, A.L.; et al. "*Leishmania*-Reactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis". *Infect Immun* 62(6): 2614-2618, 1994

DANTAS, M.L.; OLIVEIRA, J.C.; CARVALHO, L.; *et al.* "CD8+ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis". *Rev Soc Bras Med Trop* 46: 728–734. doi: 10.1590/0037-8682-0174-2013. Pmid :24474014, 2013.

DE LA FUENTE, M., MACDONALD, T. T., & HERMOSO, M. A. The IL-33/ST2 axis: Role in health and disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 26(6), 615-623, 2015.

DE LIMA BARROS, M.B., SCHUBACH, A., FRANCESCONI-DO-VALLE, A.C., GUTIERREZ GALHARDO, M.C., SCHUBACH TM, CONCEIÇÃO-SILVA, F., *et al.* Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Acta Trop.* 2005; 93: 41-7

DE LUCA, P.M. AND MACEDO, A.B.B. Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of Quality. *Front. Immunol.* 7:151. doi: 10.3389/fimmu.2016.00151, 2016.

DE OLIVEIRA CARDOSO, J. M., KER, H. G., DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D., DAS DORES MOREIRA, N., MATHIAS, F. A. S., REIS, L. E. S., *et al.* Association between mast cells, tissue remodeling and parasite burden in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary parasitology*, 243, 260-266, 2017.

DEY, A., SINGH, S. Transfusion transmitted leishmaniasis: A case report and review of literature. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24:165-70.

DISCH, J., PEDRAS, M. J., ORSINI, M., PIRMEZ, C., DE OLIVEIRA, M. C., CASTRO, M., & RABELLO, A. Leishmania (Viannia) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 51(3), 185-190, 2005.

DUDECK, A., SUENDER, C. A., KOSTKA, S. L., VON STEBUT, E., & MAURER, M. Mast cells promote Th1 and Th17 responses by modulating dendritic cell maturation and function. *European journal of immunology*, 41(7), 1883-1893, 2011.

EJAZ, A., RAZA, N., IFTIKHAR, N. Recurrent cutaneous leishmaniasis presenting as sporotrichoid abscesses: a rare presentation near Afghanistan border. *Dermatol Online J.* 2007;13 (2):15.

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

FERMINO, M. L., DIAS, F. C., LOPES, C. D., SOUZA, M. A., CRUZ, Â. K., LIU, F. T, *et al.* Galectin-3 negatively regulates the frequency and function of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells and influences the course of Leishmania major infection. *European journal of immunology*, 43(7), 1806-1817, 2013.

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

FURSOV, N., JOHNSTON, E., DUFFY, K., COTTY, A., PETLEY, T., FISHER, J., POWERS, G. Generation and characterization of rat anti-mouse ST2L monoclonal antibodies. *Hybridoma*, 30(2), 153-162, 2011.

GREEN, S. J., CRAWFORD, R. M., HOCKMEYER, J. T., MELTZER, M. S., & NACY, C. A. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of Immunology*, 145(12), 4290-4297, 1990.

GUERRA, J.A.O.; TALHARI, S.; PAES, M.G.; GARRIDO, M.; TALHARI, J.M. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:587-90

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.* 21;106(16):6748-6753, 2009.

GUO, Y., PATIL, N. K., LUAN, L., BOHANNON, J. K., & SHERWOOD, E. R. The biology of natural killer cells during sepsis. *Immunology*, 2017.

HARDMAN, C., & OGG, G. Interleukin-33, friend and foe in type-2 immune responses. *Current opinion in immunology*, 42, 16-24, 2016.

HEINZEL, F.P., SADICK, M.D., HOLADAY, B.J., COFFMAN, R.L., LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin-4 during the resolution or distinct helper T cell subsets. *Journal of Experimental Medicine* 169: 59-72, 1989.

KANE, M. M., & D. M. MOSSER. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J. Immunol.* 166: 1141–1147, 2001.

KHALID, K. E., NASCIMENTO, M. S. L., SACRAMENTO, L. A., COSTA, D. L., LIMA-JÚNIOR, D. S., CARREGARO, V., & DA SILVA, J. S. T1/ST2 deficient mice display protection against Leishmania infantum experimental infection. *Acta tropica*, 172, 1-6, 2017.

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

KOCH, S., KOHL, K., KLEIN, E., VON BUBNOFF, D., & BIEBER, T. Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis, and migration. *Journal of allergy and clinical immunology*, 117(1), 163-168, 2006.

KOLACZKOWSKA, E. & KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159–175 (2013).

KRITAS, S. K., SAGGINI, A., VARVARA, G., MURMURA, G., CARAFFA, A., ANTINOLFI, P., ROSATI, M. Impact of mast cells on the skin. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 26(4), 855, 2013.

KROPF, P., SCHOPF, L. R., CHUNG, C. L., XU, D., LIEW, F. Y., SYPEK, J. P., & MÜLLER, I. Expression of Th2 cytokines and the stable Th2 marker ST2L in the absence of IL-4 during *Leishmania major* infection. *European journal of immunology*, 29(11), 3621-3628, 1999.

JOCHIM, R. C., & C. TEIXEIRA. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. *Trends Parasitol.* 25: 145–147, 2009.

JOHN, B., & C.A. Hunter. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? *Science*. 321:917–918. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1162914>, 2008.

LASKAY, Tamás; RÖLLINGHOFF, Martin; SOLBACH, Werner. Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *European journal of immunology*, v. 23, n. 9, p. 2237-2241, 1993.

LAYEGH, P., PEZESHKPOOR, F., SORURI, A. H., NAVIAFAR, P., & MOGHIMAN, T. Efficacy of cryotherapy versus intralesional meglumine antimoniate (glucantime) for treatment of cutaneous leishmaniasis in children. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80(2), 172-175, 2009.

LEMOS, C. S. Caracterização *in situ* da resposta imune granulomatosa à *Leishmania braziliensis* em lesões dérmicas crônicas no primata *Macaca mulatta*. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Fiocruz. Tese de Doutorado, 2010.

LINDOSO, J. A. L., BARBOSA, R. N., POSADA-VERGARA, M. P., DUARTE, M. I. S., OYAFUSO, L. K., AMATO, V. S., & GOTO, H. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *British Journal of Dermatology*, 160(2), 311-318. 2009.

LIU D, UZONNA JE .The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol* 2: 83, 2012.

LIEW, F. Y., MILLOTT, S., PARKINSON, C., PALMER, R. M., & MONCADA, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *The Journal of Immunology*, 144(12), 4794-4797, 1990.

LIEW, F. Y.; XU, D.; CHAN, W. Ling. Immune effector mechanism in parasitic infections. *Immunology letters*, v. 65, n. 1-2, p. 101-104, 1999.

LOCKSLEY, R.M., HEINZEL, F.P., SADICK, M.D., HOLADAY, B.S., GARDNER, K.D JR. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Immunol* 138: 744-749, 1987

LU, J., KANG, J., ZHANG, C., & ZHANG, X. The role of IL-33/ST2L signals in the immune cells. *Immunology letters*, 164(1), 11-17, 2015.

LU, F & HUANG, S. The roles of mast cells in parasitic protozoan infections. *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 363, 2017.

LUNGER THA, Schwarz TH. Skin immune system (SIS). Bos JD – Editor, CRC press.1990; pp. 257-291.

MACHADO, P.; KANITAKIS, J.; ALMEIDA, R.; et al. "Evidence of *in situ* cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis". *Eur. J. Dermatol.* 12(5): 449-51, 2002.

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

MARETTI-MITRA, A.C.; OLIVEIRA-NETO, M.; DA-CRUZ, A.M.; et al. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin. Exp. Immunol* 163: 207-214, 2011.

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., & GHAFFARIFAR, F. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathogens and global health*, 110(6), 247-260, 2016.

MATTOS, M.S. Clinical, laboratorial and epidemiological aspects of American mucocutaneous leishmaniasis observed in Evandro Chagas Hospital - FIOCRUZ/RJ from january/1987 to december/1991. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1993;26:261-62.

MELGARES, M. C. V. Efetividade e segurança do antimoniato de meglumina nos esquemas contínuo e intermitente com dose baixa (5 mg sb5+/kg/dia) no tratamento da Leishmaniose Mucosa. Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas. Tese de Doutorado, 2012.

MENDONÇA, S. C., COUTINHO, S. G., AMENDOEIRA, R. R., MARZOCHI, M. C., & PIRMEZ, C. Human american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. *Clinical and Experimental Immunology*, 64(2), 269, 1986.

MENDONÇA, M. G., DE BRITO, M. E. F., RODRIGUES, E. H., BANDEIRA, V., JARDIM, M. L., & ABATH, F. G. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure?. *The Journal of infectious diseases*, 189(6), 1018-1023, 2004.

MENESES, C.R.; DE AZEVEDO, A.C.; DA COSTA, S.M.; et al. Ecology of American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J Vector Ecol.* 2002;27:207-14.

MENON, J. N.; BRETSCHER, P. A. Characterization of the immunological memory state generated in mice susceptible to *Leishmania major* following exposure to low doses of *L. major* and resulting in resistance to a normally pathogenic challenge. *European journal of immunology*, v. 26, n. 1, p. 243-249, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV. 1. ed., rev. e ampl. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar Brasília: Ministério da Saúde, 2017

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., QUINTELLA, L. P., SANTOS, G., SALGUEIRO, M., et al. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *British Journal of Dermatology*, 158(1), 50-58, 2008

MORGADO, F. N., SCHUBACH, A., VASCONCELLOS, E., AZEREDO-COUTINHO, R. B., VALETE-ROSALINO, C. M., QUINTELLA, L. P., et al. Signs of an in situ inflammatory reaction in scars of human American tegumentary leishmaniasis. *Parasite immunology*, 32(4), 285-295, 2010.

MORGADO, F. N., NASCIMENTO, M. T., SARAIVA, E. M., DE OLIVEIRA-RIBEIRO, C., DE FÁTIMA MADEIRA, M., DA COSTA-SANTOS, M., et al. Are neutrophil extracellular traps playing a role in the parasite control in active American tegumentary leishmaniasis lesions?. *PLoS One*, 10(7), e0133063, 2015.

MURRAY, H. W., & NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *Journal of Experimental Medicine*, 189(4), 741-746, 1999.

NASCIMENTO, M. D. D. S. B., SOUZA, E. C., SILVA, L. M. D., LEAL, P. D. C., CANTANHEDE, K. D. L., BEZERRA, et al. Prevalence of infection by *Leishmania chagasi* using ELISA (rK39 and CRUDE) and the Montenegro skin test in an endemic leishmaniasis area of Maranhao, Brazil. *Cadernos de saude publica*, 21(6), 1801-1807, 2005

NAQVI, N., AHUJA, K., SELVAPANDIYAN, A., DEY, R., NAKHASI, H., & PURI, N. Role of Mast Cells in clearance of *Leishmania* through extracellular trap formation. *Scientific reports*, 7(1), 13240, 2017.

O'CONNOR, R. A., & ANDERTON, S. M. Inflammation-associated genes: risks and benefits to Foxp3+ regulatory T-cell function. *Immunology*, 146(2), 194-205, 2015.

OLIVEIRA-CAMERA, P, JUNGER, J., PIRES, F.E.S.S., MATTOS, M., OLIVEIRA-NETO, M.P., FERNANDES, O., et al. (2006). Haematogenous Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Human American Tegumentary Leishmaniasis.

OLIVEIRA-NETO, M. P., PIRMEZ, C., RANGEL, E., SCHUBACH, A., & GRIMALDI JÚNIOR, G. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83(4), 427-435, 1988.

OLIVEIRA-NETO, M.P.; MATTOS, M.; SOUZA, C.S.F.; et al. “Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis”. *Int. J. Dermatol.* 37(11): 846-849, 1998.

OLIVEIRA, L. F. G., GILBERT, B., & BÔAS, G. K. V. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. *Revista Fitos Eletrônica*, 8(1), 2014.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C., PIMENTEL, M. I. F., OLIVEIRA, R. D. V. C., FAGUNDES, A., DE FATIMA MADEIRA, M., MELLO, C. X., et al. Clinical and laboratory profiles of patients with early spontaneous healing in cutaneous localized leishmaniasis: a historical cohort study. *BMC infectious diseases*, 17(1), 559, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 10 dezembro 2017.

PALMEIRO, M.R.; MORGADO, F.N.; VALETE-ROSALINO, C.M.; MARTINS, A.C.; MOREIRA, J.; QUINTELLA, L.P. *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., RAIFER, H., FEYERABEND, T. B., BOLLIG, N., et al. Mast cells have no impact on cutaneous leishmaniasis severity and related Th2 differentiation in resistant and susceptible mice. *European journal of immunology*, 46(1), 114-121, 2016.

PEREIRA, L. D. O. R., MOREIRA, R. B., DE OLIVEIRA, M. P., DE OLIVEIRA REIS, S., DE OLIVEIRA NETO, M. P., & PIRMEZ, C. Is *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis?. *International Journal of Infectious Diseases*, 57, 132-137, 2017.

PIMENTEL, M. I. F., BAPTISTA, C., RUBIN, É. F., LYRA, M. R., SALGUEIRO, M. D. M., SAHEKI, M. N, et al. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* resistant to meglumine antimoniate, but with good response to pentamidine: a case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(2), 254-256, 2011.

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

PODINOVSKAIA, M., & DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future microbiology*, 10(1), 111-129, 2015.

PRAJEETH, C. K., HAEBERLEIN, S., SEBALD, H., et al. Leishmania-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines, but not of NK cell cytotoxicity. *Infect. Immun.* 79, 2699–2708, 2011.

QADOUMI, M., BECKER, I., DONHAUSER, N., RÖLLINGHOFF, M., & BOGDAN, C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Infection and immunity*, 70(8), 4638-4642, 2002.

QUINTELLA, L. P., LAMBERT PASSOS, S. R., FRANCESCONI DO VALE, A. C., GUTIERREZ GALHARDO, M. C., DE LIMA BARROS, M. B., CUZZI, T, et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. *Journal of cutaneous pathology*, 38(1), 25-32, 2011.

REVEIZ, L., MAIA-ELKHOURY, A. N. S., NICHOLLS, R. S., ROMERO, G. A. S., & YADON, Z. E. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. *PLoS One*, 8(4), e61843, 2013.

LUCKHEERAM, R. V., ZHOU, R., VERMA, A. D., & XIA, B. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and developmental immunology*, 2012.

RIBEIRO-DE-JESUS, A., ALMEIDA, R. P. D., LESSA, H., BACELLAR, O., & CARVALHO, E. M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(1), 143-148, 1998.

ROBINETTE, M. L., & COLONNA, M. Innate lymphoid cells and the MHC. *Hla*, 87(1), 5-11, 2016.

RODRIGUES, A.M.; HUEB, M.; SANTOS, T.A.R.R & FONTES, CJF. Fatores ligados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimonio de meglumina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39: 139-145, 2006.

RODRIGUES, K.M.; OLIVEIRA, M.P.; MARETTI-MITRA, A.C.; et al. Influence of the Notch system in the therapeutic response of American Tegumentary Leishmaniasis. *Br. J. Dermatol* 164: 1228- 1234, 2011.

RODRIGUES, F. M. D., NETO, G. C., MENEZES, J. G. P. B., GAMA, M. E. A., GONÇALVES, E. G., SILVA, A. R, et al. Expression of Foxp3, TGF-β and IL-10 in American cutaneous leishmaniasis lesions. *Archives of dermatological research*, 306(2), 163-171, 2014

RODRIGUEZ-PINTO, D., NAVAS, A., BLANCO, V. M., RAMÍREZ, L., GARCERANT, D., CRUZ, A., et al. Regulatory T cells in the pathogenesis and

healing of chronic human dermal leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) species. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(4), e1627, 2012.

ROJAS, R.; VALDERAMA, L.; VALDERAMA, M. et al. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (*Viannia*) infection. *J. Inf. Dis.* 193: 1375-83, 2006.

ROMERO, G.A.; GUERRA, M.V.F.; PAES, M.G.; et al. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 456-465

ROSTAN, O., GANGNEUX, J. P., PIQUET-PELLORCE, C., MANUEL, C., MCKENZIE, A. N., GUIGUEN, C., et al.. The IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the livers of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *MBio*, 4(5), e00383-13, 2013.

SALDANHA, A. C. R., ROMERO, G. A. S., GUERRA, C., MERCHAN-HAMANN, E., & MACEDO, V. D. O. Comparative study between sodium stibogluconate BP 88® and meglumine antimoniate in cutaneous leishmaniasis treatment. II. Biochemical and cardiac toxicity. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33(4), 383-388, 2000.

SANTOS, D. O., COUTINHO, C. E., MADEIRA, M. F., BOTTINO, C. G., VIEIRA, R. T., NASCIMENTO, S. B., et al. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitology research*, 103(1), 1-10, 2008.

FARAH, F. S.; SAMRA, S. A.; NUWAYRI-SALTI, N. The role of the macrophage in cutaneous leishmaniasis. *Immunology*, v. 29, n. 4, p. 755, 1975.

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

SCHARTON, T. M., & SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 178(2), 567-577, 1993.

SCHOLZEN, T & GERDES, J. The Ki-67 Protein: from the known and the unknown. *Cell Physiol.* 2000; 182:311-22.

SCHUBACH, A., MARZOCHI, M. C., CUZZI-MAYA, T., OLIVEIRA, A. V., ARAUJO, M. L., OLIVEIRA, 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 58(6), 824-827, 1998.

SCHUBACH, A.; MARZOCHI, M.C.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V.; ARAÚJO, M.L.; OLIVEIRA, A.L. 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.* 1998b; 58: 824-7.

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.*

SERARSLAN, G., ATIK, E. Expression of inducible nitric oxide synthase in human cutaneous leishmaniasis. *Mol. Cell. Biochem.* 280, 147–149, 2005.

SERAFINELLA P, CANNAVO SP, VACCARO M, GUARNERI F. Leishmaniasis recidiva cutis. *Int J Dermatol* 2000; 39: 205–206.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:239-251.

SOUZA, N.A.; ANDRADE-COELHO, C.A.; VILELA ML, et al. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:759-765.

SOUZA, M. A., CASTRO, M. C. A. B., OLIVEIRA, A. P., ALMEIDA, A. F., REIS, L. C., SILVA, C. J., et al.. American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy. *Scandinavian journal of immunology*, 76(2), 175-180, 2012.

SOUZA, M.A.; CASTRO, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; et al. Cytokines and NO in American tegumentar leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microbiol Pathogenesis.* 2013;57:27-32.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life sciences*, v. 67, n. 5, p. 477-502, 2000.

STENGER, S., DONHAUSER, N., THURING, H. et al. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1996; 183:1501–14.

TAKUR, C.P.; KUMAR, M & PANDEY, A.K. Comparison of regimens of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45: 435-441, 1991.

UNGER, A., O'NEAL, S., MACHADO, P. R., GUIMARÃES, L. H., MORGAN, D. J., SCHRIEFER, A., et al. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern

Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80(4), 574-579, 2009.

VIROT, E., DUCLOS, A., ADELAIDE, L., MIALHES, P., HOT, A., FERRY, T., & SEVE, P. Autoimmune diseases and HIV infection: a cross-sectional study. *Medicine*, 96(4), 2017

ZHANG, Y., & HUANG, B. The Development and Diversity of ILCs, NK Cells and Their Relevance in Health and Diseases. In *Regulation of Inflammatory Signaling in Health and Disease* (pp. 225-244). Springer, Singapore, 2017.

WEI, X. Q., CHARLES, I. G., SMITH, A., URE, J., FENG, G. J., HUANG, F. P., LIEW, F. Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *nature*, 375(6530), 408, 1995.

WERSHIL, B. K., THEODOS, C. M., GALLI, S. J., & TITUS, R. G. Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* infection in the mouse. *The Journal of Immunology*, 152(9), 4563-4571, 1994

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Leishmaniasis: report of Who Expert Committee; World Health Organization, Geneva, p.1-15, 2010.

# **ANEXOS**

# Anexo 1

Dados clínicos dos pacientes de leishmaniose cutânea localizada (LCL) do grupo de cura espontânea (LRE). INI, Fiocruz entre 2005 a 2015

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Número de lesões	Localização	IDRM <sup>1</sup> (mm)	Evolução (meses)
1	M	54	1	MS <sup>2</sup>	23	5
2	M	47	1	Tronco	13	1,5
3	M	17	1	MI <sup>3</sup>	16	4
4	F	35	1	MI <sup>3</sup>	6	2
5	M	26	1	MS <sup>2</sup>	42	24
6	F	42	1	MI <sup>3</sup>	45	2
7	F	33	1	MI <sup>3</sup>	7	5
8	F	64	1	Tronco	0	3
9	M	52	1	MI <sup>3</sup>	0	1,5
10	F	29	1	Face	NI*	2
11	F	54	1	MI <sup>3</sup>	30	4
12	F	26	1	MI <sup>3</sup>	6	1
13	M	17	2	Tronco	9	4
14	M	22	1	MS <sup>2</sup>	32	2

**IDRM<sup>1</sup>**- Intradermoreação de Montenegro    **MS<sup>2</sup>**- Membro Superior    **MI<sup>3</sup>**- Membro Inferior    **NI\***Não informado

## Anexo 2

Dados clínicos dos pacientes de leishmaniose cutânea localizada (LCL) do grupo de boa resposta ao tratamento com antimonial pentavalente (LBR). INI, Fiocruz entre 2005 a 2015

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Número de lesões	Localização	IDRM <sup>1</sup> (mm)	Evolução (meses)
1	M	34	1	MS <sup>2</sup>	34	1
2	M	29	1	MS <sup>2</sup>	14	1
3	M	29	2	MI <sup>3</sup>	33	1
4	M	26	1	Pescoço	23	7
5	F	41	2	MI <sup>3</sup>	18	2
6	M	26	1	MS <sup>2</sup>	20	1,5
7	M	24	1	MI <sup>3</sup>	NI*	2
8	M	41	1	MI <sup>3</sup>	20	2
9	M	30	3	MI <sup>3</sup>	30	4
10	M	49	2	MI <sup>3</sup>	34	3
11	M	48	1	MI <sup>3</sup>	14	5
12	M	37	1	MI <sup>3</sup>	NI*	2
13	M	33	3	MS <sup>2</sup>	15	12
14	F	55	1	MS <sup>2</sup>	25	4

**IDRM<sup>1</sup>**- Intradermoreação de Montenegro    **MS<sup>2</sup>**- Membro Superior    **MI<sup>3</sup>**- Membro Inferior    **NI\***Não informado

## Anexo 3

Dados clínicos dos pacientes de leishmaniose cutânea localizada (LCL) do grupo de má resposta ao tratamento com antimonial pentavalente (LMR). INI, Fiocruz entre 2005 a 2015

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Número de lesões	Localização	IDRM <sup>1</sup> (mm)	Evolução (meses)
1	M	31	3	Cabeça/ Pescoço	11	2
2	M	26	3	MS <sup>2</sup> /MI <sup>3</sup>	11	1
3	M	44	9	Cabeça/Pescoço/Tronco	14	2
4	M	52	7	Cabeça/Pescoço/Tronco/MI	0	1
5	M	35	1	Tronco	12	3
6	F	39	1	MS <sup>2</sup>	19	1
7	F	21	1	MS <sup>2</sup>	NI*	1,5
8	F	40	1	MS <sup>2</sup>	30	1
9	M	31	5	MS <sup>2</sup>	15	3,5
10	M	38	1	MS <sup>2</sup>	12	4
11	M	51	1	MI <sup>3</sup>	13	2
12	M	24	2	MS <sup>2</sup>	0	2
13	M	40	5	MS <sup>2</sup> / Tronco	20	1,5
14	F	52	1	MS <sup>2</sup>	7	1

**IDRM<sup>1</sup>**- Intradermoreação de Montenegro    **MS<sup>2</sup>**- Membro Superior    **MI<sup>3</sup>**- Membro Inferior    **NI\***Não informado

**Anexo 4:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido<sup>1</sup>

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

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

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

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

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

**NOME DO VOLUNTÁRIO:** \_\_\_\_\_

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

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

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas como: de que outras maneiras a LTA pode se manifestar? como se comportam os exames de laboratório

antes, durante e após o tratamento? quais pacientes, mesmo após o tratamento, irão reabrir suas cicatrizes ou irão desenvolver doença dentro do nariz ou na garganta? Que outras doenças parecidas estão sendo confundidas com a LTA e quais exames devem ser utilizados para esclarecimento?

qual o papel dos seres humanos como reservatórios da doença? quais as melhores formas de tratamento? que medidas devem ser tomadas para controlar o problema?

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

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

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

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

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

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir as instruções do seu médico; comparecer à unidade de saúde nas datas marcadas; relatar a seu médico todas as reações que você apresentar durante o tratamento, tanto positivas quanto negativas. Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, procure o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz, mesmo fora do seu agendamento. Em caso de necessidade ligue para a Dra Cláudia Maria Valete Rosalino, Dra. Maria Inês Pimentel ou Dr. Armando de Oliveira Schubach, nos telefones acima. Caso você apresente qualquer quadro clínico que necessite de internação, a equipe médica providenciará seu leito no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz.

Sua identidade será mantida como informação confidencial. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e suas imagens poderão ser divulgadas desde que você não possa ser reconhecido. Entretanto, se necessário, os seus registros médicos estarão disponíveis para consulta para a equipe envolvida no estudo, para o Comitê de Ética em Pesquisa, para as Autoridades Sanitárias e para você. Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo, assim como a qualquer momento durante o

tratamento. O seu médico deverá oferecer todas as informações necessárias relacionadas à sua saúde, aos seus direitos, e a eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo.

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

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

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

O tratamento da LTA em pacientes humanos costuma ser com o medicamento glucantime por via intramuscular (IM), intravenosa (IV) uma injeção ao dia,

geralmente, durante um período de 30 dias contínuos ou com intervalos de descanso. Excepcionalmente, para idosos, pacientes com doenças graves ou que não tolerem o tratamento normal, poderá ser utilizada a via intralesional (IL). O tempo do tratamento poderá ser diminuído ou aumentado conforme a necessidade. Outras opções de tratamento são a anfotericina B (IV) e a pentamidina (IM), ambas injetáveis e necessitando medidas de acompanhamento parecidas com as do glucantime. Após o início do tratamento, você deverá comparecer a aproximadamente três consultas dentro de 10, 20 e 30 dias. Caso as lesões não cicatrizem totalmente, o tratamento poderá ser continuado pelo período de tempo necessário. Ao se atingir a cura clínica, você deverá retornar para consulta de reavaliação em 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o término do tratamento. E, a partir de então, pelo menos uma vez por ano durante um prazo indefinido (no mínimo 5 anos). A cada retorno deverão ser realizados avaliação médica e exames de sangue (na quantidade aproximada de uma ou duas colheres de sopa) para avaliar os efeitos dos medicamentos utilizados no seu tratamento e/ou para avaliar a evolução da doença. Outros exames, como o eletrocardiograma durante o tratamento, poderão ser realizados quando indicados.

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

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

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

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

**Formas de ressarcimento:**

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

**Benefícios esperados:**

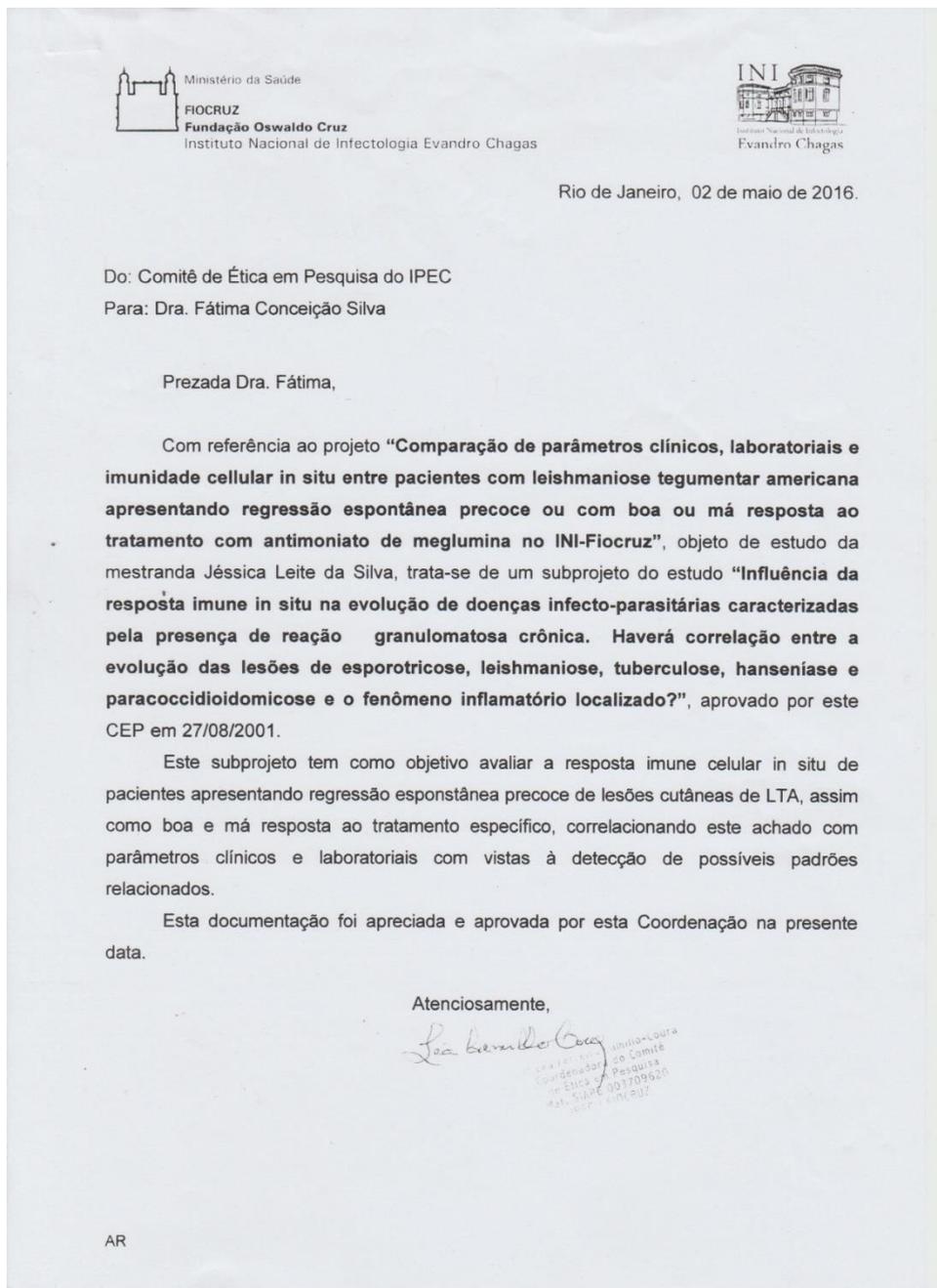
Espera-se que, ao final do tratamento, você esteja curado da LTA, embora as consultas de retorno por vários anos após o tratamento sejam necessárias para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão ou não beneficiá-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas, pois espera-se também que este estudo contribua para que o diagnóstico e acompanhamento do tratamento de pacientes com LTA possa ser feito de forma mais eficaz e segura. Caso a sua investigação demonstre outro diagnóstico diferente de LTA, você será devidamente orientado a buscar o tratamento mais adequado para o seu caso. Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas. Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo de pesquisa.

Nome	paciente:	Data
<hr/>		
Nome	médico:	Data
<hr/>		
Nome	testemunha2:	Data
<hr/>		
Nome	testemunha2:	Data

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 5

### Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



## ANEXO 6

### TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, **FÁTIMA DA CONCEIÇÃO SILVA** coordenadora e **JÉSSICA LEITE DA SILVA**, aluna do projeto de pesquisa intitulado “**COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E DE IMUNIDADE CELULAR *IN SITU* ENTRE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA QUE APRESENTARAM REGRESSÃO ESPONTÂNEA PRECOCE, BOA RESPOSTA OU MÁ RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ATENDIDOS NO INI, FIOCRUZ**”, 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

---

Jéssica Leite da Silva