

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



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

LÍVIA MARTINS VELOSO DE CARVALHO

**COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS,
LABORATORIAIS E DE IMUNIDADE CELULAR
ENTRE A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA COM APRESENTAÇÃO CLÍNICA
ESPOROTRÍCIDO E A FORMA DE
APRESENTAÇÃO TÍPICA DA DOENÇA.**

Rio de Janeiro

2012

DISSERTAÇÃO MPCDI-PEC L.M.V.CARVALHALHO 2012

**COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS,
LABORATORIAIS E DE IMUNIDADE CELULAR
ENTRE A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA COM APRESENTAÇÃO CLÍNICA
ESPOROTRÍCOIDE E A FORMA DE
APRESENTAÇÃO TÍPICA DA DOENÇA.**

LÍVIA MARTINS VELOSO DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para a obtenção de grau de Mestre em Ciências, sob a orientação da Dra Fátima Conceição-Silva e da Dra Maria Inês Fernandes Pimentel

Rio de Janeiro

2012

LÍVIA MARTINS VELOSO DE CARVALHO

**Comparação de parâmetros clínicos,
laboratoriais e de imunidade celular entre a
leishmaniose tegumentar americana com
apresentação clínica esporotricóide e a forma de
apresentação típica da doença.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para a obtenção de grau de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Dra Fátima Conceição-Silva e da Dra Maria Inês Fernandes Pimentel

BANCA EXAMINADORA

Dr. Armando de Oliveira Schubach
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

Dra. Maria de Fátima Madeira
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

Dra. Fernanda Nazaré Morgado
Fundação Técnico-Educacional Souza Marques

Dra. Mariana Reuter Palmeiro
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao Marcílio, companheiro e incentivador em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Fátima Conceição-Silva pelo apoio e por todos os ensinamentos, minha admiração.

À minha co-orientadora Maria Inês Pimentel pela confiança depositada desde o início, minha enorme gratidão.

A todos do Laboratório de Imunoparasitologia pela amizade, em especial à Fernanda Morgado pela orientação e disponibilidade sempre e à Simone Mendes pela ajuda nos momentos mais difíceis.

A todos os funcionários do IPEC-FIOCRUZ: meus agradecimentos.

À Coordenação da Pós-graduação meus agradecimentos pela colaboração e auxílio.

A todos os professores do Curso de Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas-IPEC/FIOCRUZ pela dedicação.

Aos pacientes que padecem de Leishmaniose Tegumentar Americana, pois são o motivo para a realização do estudo e sem os quais ele seria impossível.

Ao IOC e IPEC/FIOCRUZ, ao CNPq e à FAPERJ pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais pelo amor e compreensão sempre dedicados.

Ao meu esposo pela paciência e carinho.

Ao meu filho que veio tornar esta jornada ainda mais interessante.

À Deus principalmente, pela saúde e força para superar os obstáculos mais difíceis.

“...O correr da vida embrulha tudo; a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. Ser capaz de ficar alegre e mais alegre no meio da alegria, e ainda mais alegre no meio da tristeza...”

“No fim tudo dá certo... se não deu certo, é porque não chegou o fim!”

([Guimarães Rosa](#))

Carvalho, L.M.V. **Comparação de parâmetros clínicos, laboratoriais e de imunidade celular entre a leishmaniose tegumentar americana com apresentação clínica esporotricóide e a forma de apresentação típica da doença.** Rio de Janeiro, 2012. 2012. 69f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta formas clínicas variadas, podendo simular outras doenças. A forma esporotricóide da leishmaniose é relativamente incomum, e apresenta-se como úlcera de inoculação com nódulos e/ou gomas ao longo de trajeto linfático. Tal apresentação torna-se particularmente relevante no contexto da epidemia de esporotricose vivenciada no Rio de Janeiro há pouco mais de uma década, pois ambas as enfermidades compartilham espaços físicos semelhantes neste estado. No intuito de compreender melhor a forma esporotricóide da LTA (LE), em especial o papel da resposta imune celular na determinação desta apresentação clínica peculiar, estudamos o comportamento clínico, epidemiológico e imunológico *in situ* destes pacientes, comparando os resultados obtidos com os de pacientes que apresentam formas clínicas típicas de leishmaniose cutânea (LC). O estudo compreendeu 494 pacientes consecutivamente atendidos no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil, entre janeiro de 2004 e dezembro de 2010, tendo sido excluídos os pacientes com leishmaniose mucosa e com leishmaniose difusa anérgica atendidos no período, e foi dividido em duas etapas. Na primeira, foi feita uma análise clínica, comparando-se as características clínicas e epidemiológicas de 23 pacientes com diagnóstico de LE e 471 pacientes com LC. Demonstrou-se que 14 (60,9%) pacientes de LE eram do sexo feminino; a média de idade era de 44,74 anos; doze pacientes (52,2%) tiveram lesões localizadas em membros superiores ($p = 0,037$). Já no grupo com LC predominava o sexo masculino, com 304 (64,5%) pacientes ($p = 0,024$); a média de idade era de 35,94 anos ($p = 0,032$); e as lesões localizavam-se nos membros inferiores em 38% dos casos ($p = 0,048$). A distribuição entre os sexos, a idade e a localização das lesões foram consideradas significativamente diferentes entre os dois grupos. Na segunda etapa, realizou-se a análise imunohistoquímica de fragmentos obtidos através de biópsia de lesões cutâneas de 15 pacientes com LE comparados com os de 30 pacientes de LC. Observou-se que o infiltrado inflamatório, de distribuição heterogênea nas lesões de pacientes com LC, era mais intenso nas lesões dos pacientes com LE, que apresentavam ainda grande quantidade de tecido fibrótico. Observamos elevação significativa do percentual de neutrófilos (média LE = 21,21; LC = 13,53; $p=0,019$), maior intensidade da Óxido Nítrico Sintase 2, e diminuição da concentração de células Bcl2 (média LE = 22,58; LC =

32,98; $p=0,036$), conferindo à forma esporotricóide de LTA um caráter mais inflamatório e destrutivo quando comparada com a forma típica da doença. Os resultados demonstram que a LTA esporotricóide pode se assemelhar clínica e imunologicamente com a esporotricose cutaneolinfática, sugerindo-se um estudo comparativo entre ambas.

Palavras-chave: 1. *Leishmania*. 2. leishmaniose esporotricóide. 3. Resposta imune celular. 4. LTA. 5. LTA atípica

Carvalho, L.M.V. **Comparison of clinical, laboratory and cellular immunity between the clinical presentation of sporotrichoid leishmaniasis and the typical presentation of the disease.** Rio de Janeiro, 2012. 69f. [Master in Science dissertation in Clinic research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) has varied clinical presentations and can mimic other diseases. The sporotrichoid form of leishmaniasis is relatively uncommon and clinically may presents as an ulcer with nodules and / or gums along lymphatic pathways. This presentation is particularly relevant in the context of the epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro State experienced for a little more than a decade, because both diseases share endemic areas there. In order to better understand sporotrichoid leishmaniasis (SL), in particular the role of cellular immune response in determining this peculiar clinical presentation, we studied the clinical, epidemiological and immunological *in situ* behavior of these patients, comparing the results with those of patients presenting typical clinical forms of cutaneous leishmaniasis (CL). The study comprised 494 consecutive patients treated at the Leishmaniasis Surveillance Laboratory at Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, between January 2004 and December 2010; patients with mucosal leishmaniasis and cutaneous diffuse anergic leishmaniasis attended at this period of time were excluded. It was divided into two steps. At first a clinical analysis was made, comparing the clinical and epidemiological characteristics of 23 patients with SL and 471 patients with CL. It was demonstrated that 14 (60.9%) of the SL patients were female; their average age was 44.74 years; twelve patients (52.2%) had lesions in the upper limbs ($p = 0.037$). In the CL group males predominated, with 304 (64.5%) of the patients ($p = 0.024$); the average age was 35.94 years ($p = 0.032$); and lesions were located in the lower limbs in 38% of cases ($p = 0.048$). Gender distribution, age and location of the lesions were considered significantly different between the two groups. In the second step, immunohistochemical analysis of lesion samples from skin lesions in 15 patients with SL was performed and compared with those of 30 CL patients. It was observed that the inflammatory infiltrate, which was heterogeneously distributed in the lesions of patients with CL, was more intense in lesions of patients with SL, which additionally had large amounts of fibrotic tissue. We observed an increase in the percentage of neutrophils (mean SL = 21.21; CL = 13.53; $p = 0.019$), greater intensity of nitric oxide synthase 2, and decreased concentration of Bcl2 cells (mean SL = 22.58; LC = 32.98; $p = 0.036$), giving the SL form more inflammatory and destructive characteristics when compared with the typical form of the disease. The results showed important differences in the characterization of clinical presentation of ATL that can be useful during the diagnostic procedures.

Keywords: 1. *Leishmania*. 2. Sporotrichoid leishmaniasis. 3. Cellular immune response. 4. ATL. 5. Atypical ATL

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC – *Aminoethyl carbazole*

APC – *Antigen-presenting cells*, Células Apresentadoras de Antígenos

BALB/C – Linhagem de camundongos susceptíveis à maioria das espécies de *Leishmania* que desenvolvem infecção no modelo murino de estudo.

BAX – Bcl-2 - associated X protein, proteína da família gênica Bcl-2.

BID – BH3 - membro pro-apoptótico da família de proteínas Bcl-2.

Bcl-2 – Família de proteínas reguladoras da apoptose.

CEP-IPEC – Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC

CTL – *Cytolytic T Lymphocyte*, Linfócito T Citotóxico

DNA – *Deoxyribonucleic acid*, Ácido desoxirribonucléico

ELISA – *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*, Ensaio Imunoenzimático

Fas – receptor membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral alfa, número 6

FasL – *Fas ligand*, proteína transmembrana tipo II pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral alfa, relacionada à apoptose celular.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

G0 – *Gap 0*, fase de repouso do ciclo celular (célula quiescente ou senescente)

G1, S, G2, mitose – Fases ativas do ciclo celular (*Gap 1, Synthesis, Gap 2, Mitosis*)

HE – Hematoxilina-eosina

IDRM – Intradermorreação de Montenegro

RIFI – Imunofluorescência indireta

IFN- γ – Interferon- γ

IL – Interleucina

iNOS – *Nitric oxide synthases inducible*, Óxido Nítrico Sintase induzido

IPEC – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

Ki67 – Proteína nuclear associada à proliferação celular

Lab Vigileish – Laboratório de Vigilância em Leishmanioses

Lb-Ag – Antígeno de *Leishmania braziliensis*

LC – Leishmaniose Cutânea com apresentação típica
LCC – Leishmaniose cutânea crônica
LCD – Leishmaniose cutânea difusa
LCL – Leishmaniose cutânea localizada
LE – Grupo de pacientes com apresentação esporotricóide de LTA
LIP – Laboratório de Imunoparasitologia
LM – Leishmaniose mucosa
LPS – Lipopolissacarídeo
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
MHC – *Major Histocompatibility Complex*, Complexo principal de histocompatibilidade
MHC-II – *Major Histocompatibility Complex*, Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MØ – Macrófago
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ND – Não determinado
NET – *Neutrophil extracellular traps*, redes (armadilhas) extracelulares de neutrófilos
NEUT – Neutrófilo
NK – *Natural killer cell*, Célula matadora natural
NNN – Meio Novy, MacNeal, Nicolle
NO – *nitric oxid*, Óxido nítrico
NOS2 – *nitric oxid synthase 2*, Óxido nítrico sintase do tipo 2
PCR – *polymerase chain reaction*, Reação em cadeia da polimerase
PPD – Derivado protéico purificado
RNAm – *ribonucleic acid*, Ácido ribonucléico mensageiro
ROI – *reacts oxygen intermediate*, Intermediários reativos de oxigênio
SEM – Erro mínimo
TCD8+ - Linfócitos T citotóxicos
TGF- β – *transforming growth factor*, Fator de crescimento tumoral- β
TH – *T Helper*, Linfócito T auxiliar
TH1 – *T Helper 1*, Linfócito T auxiliar 1
TH2 – *T Helper 2*, Linfócito T auxiliar 2
TNF- α – *T necrosis factor*, Fator de necrose tumoral- α

Toll-like receptors – Receptores Toll-like, proteínas transmembrânicas que fazem parte do sistema imune inato

Tx-Ag – Antígeno de *Toxoplasma gondii*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação entre as formas clínicas da esporotricose linfocutânea e da LTA esporotricóide.....	5
Figura 2: Mapa do Rio de Janeiro mostrando áreas sombreadas de ocorrência de casos de esporotricose.....	6
Figura 3: Comparação do IDRM entra a LTA esporotricóide e a LTA típica.....	29
Figura 4: Comparação da expressão de elastase neutrofilica e NET em (a, b, c) lesões de LTA esporotricóide e (d, e, f) lesões de LTA típica. NEU – Neutrófilos. Aumento 100x em (a, d), 400x em (b,c,e,f)	31
Figura 5: Contagem percentual e por mm ² dos marcadores estudados nas lesões cutâneas de LTA esporotricóide em comparação à LTA típica. (A) Elastase neutrofilica, (B) %Bcl-2, (C) %Ki-67, (D) %Fas e (E) %FasL. A linha corresponde à mediana. P < 0,05 foi considerado significativo. LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana.....	33
Figura 6: Contagem percentual e por mm ² dos marcadores estudados nas lesões cutâneas de LTA esporotricóide em comparação à LTA típica. (A) %CD3, (B) CD1a/mm ² , (C) %CD4, (D) %CD8, (E) %CD22 e (F) %macrófagos. A linha corresponde a mediana. P < 0,05 foi considerado significativo. LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana.....	35
Figura 7: Lesão de LTA esporotricóide: (a) células T CD3+, (b) células T CD4+, (c) células T CD8+, (d) células T CD68+, (e) neutrófilos, (f) células Ki67+. As células consideradas positivas apresentam coloração castanha-avermelhada de intensidade e distribuição variáveis, na dependência do marcador utilizado. O tecido foi contracorado com hematoxilina de Meyer que produz coloração azul-acastanhada. Aumento 400x nas fotos d e f e aumento de 100x nas demais fotos.....	36
Figura 8: Contagem percentual dos marcadores estudados nas lesões cutâneas de LTA Esporotricóide em comparação à LTA Típica. (A) Leishmania/mm ² e (B) intensidade de expressão de NOS2. A linha corresponde	37

a mediana. $P < 0,05$ foi considerado significativo. LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com lesões cutâneas típicas e esporotricóide de LTA.....	27
Tabela 2: Resultados dos exames laboratoriais de 23 pacientes com forma esporotricóide de leishmaniose cutânea. IPEC, FIOCRUZ, 2004-2010	29
Tabela 3: Contagem percentual e por mm ² dos marcadores estudados nos sítios de lesões cutâneas de LTA esporotricóide em comparação à LTA típica.....	32
Tabela 4: Comparação de intensidade da expressão da enzima Óxido Nítrico Sintase entre os pacientes de LTA esporotricóide e LTA típica.....	38

SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1 A Leishmaniose Tegumentar Americana	01
1.2. O Diagnóstico	07
1.3. Marcadores de Perfil Celular e Inflamação	12
2. Justificativa	17
3. Objetivos	19
3.1. Objetivo Geral	19
3.2. Objetivos Específicos	19
4. Material e Métodos	20
4.1. Seleção de Pacientes	20
4.2. Análise Clínica: Avaliação Comparativa dos Parâmetros Clínicos, Laboratoriais e de Resposta ao Tratamento nos Pacientes com Apresentação Cutânea Típica e Esporotricóide da Leishmaniose Tegumentar Americana	20
4.2.1. Análise estatística do estudo clínico	22
4.3. Análise Imunohistoquímica: Estudo comparativo dos parâmetros de resposta imune <i>in situ</i> , identificados nos pacientes com apresentação típica e Esporotricóide da Leishmaniose Tegumentar Americana	20
4.3.1. Coleta de material biológico	23
4.3.2. Preparação dos fragmentos teciduais	24
4.3.3. Imunohistoquímica	24
4.3.4. Análise estatística do estudo <i>in situ</i> por imunohistoquímica	26
5. Resultados	28
5.1. Avaliação dos aspectos clínicos, laboratoriais e de resposta ao tratamento nos grupos estudados	28
5.2. Estudo da resposta imune <i>in situ</i> nos grupos estudados	33
6. Discussão	43

7. Conclusões	51
8. Referências Bibliográficas	52
9. Anexos	60
Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido	60
Anexo 2 - Termo de compromisso e responsabilidade	67
Anexo 3 - Parecer de aprovação CEP - IPEC/FIOCRUZ	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa causada por protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao gênero *Leishmania*, transmitidos por algumas espécies de insetos flebotomíneos (Mattos, 1993; Guerra et al, 2003; Silveira, Lainson & Corbett, 2004). Duas formas principais de apresentação clínica podem ser identificadas: a forma tegumentar (acometendo pele e mucosas _ LTA) e a forma visceral (acometendo órgãos e tecidos do sistema linfohematopoiético). O Brasil apresenta a prevalência mais alta das Américas (Vieira-Gonçalves et al, 2008) e a transmissão é verificada em todos os estados da Federação. A forma visceral está em franca expansão territorial no país e a forma tegumentar pode ser encontrada em todo território nacional (Ministério da Saúde, 2010).

Nas Américas a forma visceral é causada por *Leishmania chagasi* e na forma tegumentar pelo menos 16 diferentes espécies de *Leishmania* foram identificadas como agentes causais de LTA em ambos os subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Silveira, Lainson & Corbett, 2004; Baptista et al, 2009). 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, do sul do Pará ao Nordeste, atingindo também o centro sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental (Ministério da Saúde, 2010), sendo o agente mais frequentemente encontrado no Brasil. É a espécie prevalente no estado do Rio de Janeiro com padrão de transmissão intra e peri-domiciliar. (Meneses et al, 2002; Souza et al, 2002)

A LTA pode cursar com comprometimento cutâneo, mucoso e linfonodal, apresentando grande diversidade de manifestações. O quadro clínico da Leishmaniose depende não somente das espécies infectantes, mas também da resposta imune do hospedeiro, principalmente a resposta imune mediada por células. Outros fatores que afetam a apresentação clínica incluem: quantidade de parasitas inoculados, local da inoculação, presença de comorbidades e o

estado nutricional do hospedeiro (Farah Klaus & Frankenburg, 1993). *Leishmania (Viannia) braziliensis* está associada com leishmaniose cutânea e mucocutânea e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com leishmaniose cutânea, inclusive com a forma difusa anérgica (Silveira, Lainson & Corbett, 2004; Azeredo-Coutinho et al, 2007; Ministério da Saúde, 2010). A maioria dos pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* apresenta a forma cutânea típica, com localizações variadas. (Barral et al, 1992; Barral et al, 1995).

A LTA pode apresentar-se nas formas cutânea, mucosa e difusa, sendo a lesão cutânea o aspecto clínico mais freqüente. A leishmaniose cutânea (LC) é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor, para qualquer das espécies de *Leishmania* causadoras da doença. Predomina nas áreas corpóreas descobertas e se instala em pacientes de áreas endêmicas ou que lá estiveram recentemente. Pode ter decurso abortivo ou assumir caráter tórpido, para terminar em regressão espontânea, conforme observado em vários focos brasileiros. Em número importante de casos, a infecção progride e, após um período de latência clínica que pode abranger vários meses de duração, surgem as lesões cutâneas (Furtado, 1994). A lesão cutânea típica se caracteriza pela presença de uma ou poucas úlceras indolores com bordas elevadas, infiltradas, eritematovioláceas (“bordas em moldura”) e fundo granuloso com pouca secreção. (Furtado, 1980; Ejaz, Raza & Iftikhar, 2007; Ministério da Saúde, 2010). Linfangite e adenite regional podem preceder ou acompanhar as lesões de pele (Furtado, 1980; Ministério da Saúde, 2010).

Nos casos progressivos a evolução das lesões pode produzir notável polimorfismo, sendo possível encontrar formas impetigóide, liquenóide, tuberculosa ou lupóide, nodular, vegetante, ectimatóide e esporotricóide. (Ejaz, Raza & Iftikhar, 2007).

A leishmaniose cutânea apresenta-se sob as formas clínicas localizada, disseminada, recidiva cutis e difusa (Ministério da Saúde, 2010). A forma cutânea localizada (LCL) representa o acometimento primário da pele. A lesão é geralmente do tipo úlcera, com tendência a cura espontânea e apresentando boa resposta ao tratamento, podendo ser única ou múltipla. (Ministério da Saúde, 2010). A forma cutânea disseminada (LCD) é relativamente rara, sendo

as duas espécies reconhecidas como causadoras desta síndrome *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. Esta forma de apresentação é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões ulceradas (≥ 10), papulosas e/ou de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com freqüência a face e o tronco. O número de lesões pode alcançar centenas. A adenomegalia raramente é detectada nos pacientes com a forma disseminada e quando se apresenta é de forma discreta (Ministério da Saúde, 2010). As lesões, em geral, não cicatrizam espontaneamente e são resistentes ao tratamento medicamentoso (Costa et al, 1992). A forma recidiva cútis caracteriza-se por evoluir com cicatrização espontânea ou medicamentosa da úlcera, seguida de reativação localizada geralmente na borda da lesão. A resposta terapêutica é pobre ou ausente e geralmente a intradermorreação de Montenegro (IDRM) apresenta-se positiva. A forma cutânea difusa (LCD) é causada por *L. (L.) amazonensis*. Constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* spp. A resposta terapêutica é pobre ou ausente e geralmente a IDRM apresenta-se negativa (Ministério da Saúde, 2010). As lesões com infiltração cutânea pronunciada simulam quadro de hanseníase virchowiana (Pearson & Sousa, 1996; Grevelink & Lerner, 1996).

As formas cutâneas devem ser principalmente diferenciadas das úlceras traumáticas, úlceras de estase, úlcera tropical, úlceras de membros inferiores por anemia falciforme, piodermites, paracoccidiodomicose, esporotricose e outras micoses subcutâneas, neoplasias cutâneas, sífilis e tuberculose cutânea (Gontijo, 2003).

Em alguns casos, surgem lesões mucosas, conseqüentes à disseminação hematogênica e/ou linfática do parasita, caracterizando a forma mucosa da LTA (Furtado, 1980; Ministério da Saúde, 2010). A leishmaniose mucosa (LM) classicamente ocorre após anos do surgimento da lesão cutânea, sugerindo uma possível disseminação dos parasitas por via hematogênica, embora possam ocorrer de forma isolada ou concomitante a lesões cutâneas (Silveira et al., 2008). Inicia-se com inflamação e intumescimento da mucosa nasal, seguida de ulceração e destruição de cartilagens e ossos do nariz, progredindo para áreas vizinhas (Marsden & Nonata, 1975). As lesões

mucosas, ao contrário das úlceras cutâneas, possuem difícil tratamento e nunca cicatrizam espontaneamente, além de estarem sujeitas a infecções secundárias que podem evoluir de forma fatal (Marsden, 1986). Os fatores que contribuem para que uma doença inicialmente cutânea evolua para essa forma tardia não são de todo conhecidos, mas sabe-se que a demora na cicatrização da lesão primária e tratamento inicial inadequado podem estar associados com esta evolução. O acometimento de outras mucosas que não as das vias aéreas superiores é excepcional (Marsden, 1986).

Nas lesões mucosas, o diagnóstico diferencial deve ser feito principalmente com a paracoccidiodomicose, hanseníase virchowiana, rinoscleroma, boubá, sífilis terciária, granuloma facial da linha média e neoplasias (Gontijo, 2003).

No Rio de Janeiro, a forma cutânea que tem revelado grande importância é a esporotricíde. Esta forma da leishmaniose cutânea é definida pela presença de nódulos dérmicos e hipodérmicos ao longo do cordão linfático a partir da lesão primária de inoculação (Masmoudi et al, 2008). Nesta forma, os nódulos são considerados como representação de reação imune pela extensão direta de organismos ou antígenos de *Leishmania* spp nos vasos linfáticos (Bari & Rahman, 2008).

A denominação “esporotricíde” é feita em analogia com a forma clínica mais comum da esporotricose, em que a maioria dos casos se apresenta como úlceras, linfangite e gomas ao longo do trajeto linfático (conhecida como “forma cutâneo-linfática” da enfermidade), como mostrado na figura 1-a, figura 1-b. A esporotricose é uma micose subcutânea granulomatosa, causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, que acomete o homem e uma grande variedade de animais (Kauffman, 1999). O microrganismo é encontrado no solo e vegetação e a infecção se dá por inoculação traumática (Chapman & Daniel, 1994). O diagnóstico diferencial com a LTA é particularmente importante no Rio de Janeiro, já que este estado vem apresentando uma endemia de esporotricose nas últimas décadas, relacionada à transmissão por gatos infectados (De-Lima-Barros et al, 2001). Este tipo de transmissão zoonótica, antigamente considerada ocasional, tornou-se a forma mais comum da doença, afetando principalmente mulheres (Barros et al, 2004). Com isto, percebeu-se uma mudança no padrão epidemiológico da esporotricose, que antes tinha

maior ocorrência no sexo masculino e em profissionais como jardineiros, fazendeiros e horticulturistas (Chapman & Daniel, 1994). A experiência dos profissionais do IPEC envolvidos com o diagnóstico de ambas as enfermidades indica que ocorre uma superposição entre suas áreas endêmicas, como indicado na figura 2, o que é especialmente relevante devido à reatividade sorológica para *Leishmania* spp e pela IDRМ entre pacientes que apresentam esporotricose, dificultando ainda mais o diagnóstico diferencial entre estas condições (De-Lima-Barros et al, 2001, De-Lima-Barros et al, 2005).

Devido à sua relativa raridade, muitos pacientes de leishmaniose esporotricóide são erroneamente diagnosticados e inadequadamente tratados (Iftikhar, Bari & Ejaz, 2003; Bari & Raham, 2006).



Figura 1 - Comparação entre as formas clínicas da esporotricose linfocutânea (figuras a e b) e da LTA esporotricóide (figuras c e d).

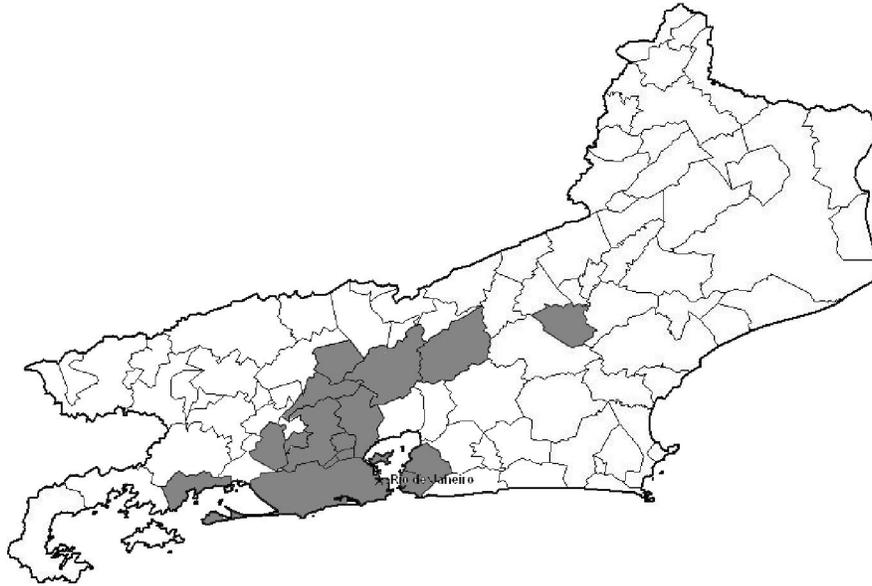


Figura 2 - Mapa do estado do Rio de Janeiro. As áreas sombreadas constituem municípios de ocorrência de casos de esporotricose. Em todo o estado ocorre LTA. Adaptado de Barros et al, 2004.

1.2 O DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de LTA nem sempre é uma tarefa fácil, pois abrange, além de diversos aspectos clínico-epidemiológicos, algumas características imunológicas. Os métodos parasitológicos são considerados de certeza, porque se baseiam na evidência do parasita de forma direta ou indireta. As técnicas clássicas são o exame de esfregaços de tecido corados pelo Giemsa e a cultura de tecido. Na pesquisa direta, a chance de se encontrar o parasita é inversamente proporcional ao tempo de duração da lesão e a sensibilidade do método nos casos produzidos por *L. braziliensis* está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses (Furtado, 1980). No caso da LM, a cultura costuma ser mais sensível para o diagnóstico do que a microscopia direta. Segundo dados da literatura, o isolamento do parasita em fragmento de lesão semeado em meios de cultura apropriados, como o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle – NNN permite a visualização de formas promastigotas com valores de sensibilidade em torno de 50% (Furtado, 1980; Romero et al, 2001).

O exame histopatológico pode ser útil para a realização do diagnóstico de LTA, embora a principal característica deste exame seja descartar outras doenças granulomatosas, infecções fúngicas ou outros diagnósticos. Alguns relatos, no entanto, referem que tanto esfregaços corados pelo Giemsa quanto a cultura são considerados mais sensíveis do que a histopatologia no diagnóstico de LTA (Convit et al, 1993). Os índices de sensibilidade dos exames histopatológicos na literatura apresentam ampla variação (Furtado, 1980; Amato Andrade & Duarte, 2003), entretanto a imunohistoquímica demonstra significativamente maior sensibilidade que a coloração por hematoxilina-eosina para a detecção do parasita (Quintella et al, 2009).

As alterações histopatológicas são inespecíficas e podem variar de acordo com a espécie de *Leishmania* e a resposta imunológica do hospedeiro. A epiderme pode apresentar hiperplasia pseudoepiteliomatosa, além de hiperqueratose, parakeratose, degeneração das células basais, atrofia ou acantose e ocasionais abscessos intraepidérmicos (Grevelink et al., 1996). Na derme observa-se, nas lesões iniciais, infiltrado composto por macrófagos parasitados, frequentemente esboçando ou formando granulomas, geralmente desorganizados, histiócitos, linfócitos, células gigantes e plasmócitos. (De Magalhães et al., 1982; De Magalhães et al., 1986). A LM caracteriza-se por lesões granulomatosas necrotizantes com escassez de parasitas, enquanto as formas difusas exibem riqueza de parasitas, grande quantidade de histiócitos, raros linfócitos e plasmócitos (Gontijo, 2003).

O diagnóstico imunológico pode ser realizado por testes sorológicos ou através de teste intradérmico. Os testes sorológicos mais usados são ELISA, imunofluorescência e testes de aglutinação. Nos pacientes com leishmaniose cutânea, constatam-se níveis geralmente baixos ou moderados de anticorpos específicos detectados por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) ou ensaio imunoenzimático (ELISA), em comparação com os níveis mais elevados encontrados nos pacientes com formas mucosas da enfermidade; entretanto, existem variações individuais (Anthony Christensen & Johnson, 1980; Guimarães et al, 1983).

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) ou Teste de Montenegro constitui-se num marcador para avaliação da resposta celular de hipersensibilidade retardada a antígeno de *Leishmania* inoculado por via

intradérmica, sendo amplamente utilizada para diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos (Marzochi et al, 1980; Cuba-Cuba et al, 1985; José et al, 2001; Manzur & Bari, 2006). É geralmente o único exame complementar disponível para o diagnóstico de LTA em muitas unidades de saúde. Pode ser negativa nas primeiras quatro a seis semanas a partir do início da lesão cutânea (Ministério da Saúde, 2010), e, nos indivíduos residentes em áreas endêmicas que não apresentam lesão ativa ou cicatriz sugestiva de leishmaniose, sua positividade varia entre 20 e 30% (Fagundes, 2007; Ministério da Saúde, 2010). Sua positividade independe da duração das lesões, do sexo ou da idade dos pacientes (Sadeghian et al, 2006), sendo de alta sensibilidade. A positividade da IDRM próxima a 100% é relatada por diversos autores (Furtado, 1980, Mendonça et al, 1986). No entanto, a ocorrência de IDRM positiva em casos de esporotricose confirmada já foi alvo de investigação no Rio de Janeiro (De Lima Barros et al, 2005), e pode ser um complicador para o diagnóstico, já que a positividade não está diretamente relacionada à presença de úlceras de LTA em atividade. Várias possibilidades foram propostas para explicar este fato: co-infecção, reação cruzada entre estas duas condições, e alergia ao diluente (quando o timerosal ou o formol é usado nas preparações do reagente, podendo induzir uma reação de hipersensibilidade cutânea, causando resultados falso-positivos) (Pineda et al, 2001; De Lima Barros et al, 2005). Outra possibilidade é a positividade encontrada nos indivíduos de área endêmica sem história de lesões de LTA, mas que podem vir a apresentar lesões de outras etiologias.

As técnicas moleculares, entre elas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), vêm sendo cada vez mais aplicadas no diagnóstico de LTA devido à sua elevada sensibilidade, além de possibilitar a diferenciação das espécies de *Leishmania*. (Rodriguez et al., 1994).

Com a PCR foi possível também a análise da expressão de citocinas *in situ* em lesões produzidas por *L. braziliensis* e alguns autores sugerem seu uso como diagnóstico e prognóstico da evolução das lesões. Os estudos demonstraram que nas lesões cutâneas predomina interferon gama (IFN- γ), enquanto nas formas mucosas há uma mistura de citocinas produzidas por linfócitos T auxiliares 1 e 2 (Th1 e Th2) com predomínio de interleucina 4 (IL-4) (Pirmez et al., 1993). Os autores sugeriram que o curso clínico de LTA poderia

estar associado ao padrão de citocinas apresentado, onde o predomínio de um padrão de resposta Th1 levaria a destruição do parasita e consequente resolução da lesão cutânea. Na forma mucosa, o aumento exacerbado da resposta tipo Th2, associado à presença de IL-4, resultaria na típica cronicidade desta forma clínica.

Estudos demonstraram que lesões cutâneas iniciais causadas pela infecção com *L. (V.) braziliensis* têm maiores níveis de produção de fator de crescimento tumoral beta (TGF- β). Provavelmente este fator de crescimento é produzido por macrófagos recentemente infectados e está diretamente relacionado com o estabelecimento da infecção nos estágios iniciais da doença (Barral-Neto et al, 1995).

A compreensão exata do mecanismo pelo qual ocorre o controle da infecção ainda é desconhecida, apesar de se conhecer o importante papel desempenhado pelas citocinas. Recentemente foi observada uma maior expressão de IFN- γ , IL-10 e TGF β em lesões de pacientes que evoluíram com pior resposta ao tratamento (Marreti-Mitra et al., 2010).

Por que na LTA alguns pacientes desenvolvem lesão com tendência a disseminação linfática e formação de lesões múltiplas no trajeto destes vasos? Para esclarecer esta questão podemos cogitar que a resposta imune do hospedeiro é determinante, já que estudos recentes têm mostrado que *L. braziliensis* circulante no Rio de Janeiro é bastante homogênea (Azeredo-Coutinho et al, 2007; Baptista et al, 2009). Como as lesões de LTA são caracterizadas pela reação inflamatória do tipo crônico granulomatoso, com intensa infiltração linfoplasmocitária (Quintella et al, 2009), no modelo murino de estudo e experimentação, a formação da úlcera tem sido sugerida como sendo decorrente do processo inflamatório, e não necessariamente pela presença do parasita (Belkaid et al, 2002). 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.

Nas lesões típicas, ou seja, naquelas com presença de úlceras com bordas infiltradas e fundo granuloso, já foi descrita a predominância de linfócitos T, macrófagos (M \emptyset) e neutrófilos (NEU) (Morgado et al, 2008). Na LTA típica, as lesões são caracterizadas também pela intensa atividade de M \emptyset ativados aos estágios parasiticidas através da predominância da resposta

imune celular do tipo 1 (Pirmez et al, 1993; Morgado et al, 2008). Pirmez et al (1993) sugerem que o curso clínico da infecção por *Leishmania braziliensis* no homem estaria associado com o padrão local específico de produção de citocinas, pois observaram predominância relativa de ácidos ribonucléicos mensageiros (RNAs) de citocinas do tipo 1 como a IL-2, IFN- γ e linfotoxinas em lesões cutâneas localizadas e em reações de hipersensibilidade tardia provocadas pelo teste de Montenegro. Nas lesões provenientes de formas crônicas e mucocutâneas destrutivas da leishmaniose havia a presença simultânea de RNAs de citocinas do tipo 1 e 2, porém com marcante abundância de IL-4.

É bem estabelecido que desequilíbrio nesta resposta para mais ou para menos produza lesões mais graves, respectivamente, lesões mucosas e a forma cutânea difusa (Ministério da Saúde, 2010). Com base nestes dados, duas hipóteses surgem para a compreensão do desenvolvimento de lesões mais agressivas como aquelas da forma esporotricóide da LTA: 1 – A carga parasitária é maior nestes casos levando ao maior estímulo da resposta imune específica; 2 – A resposta imune local no paciente apresentando forma esporotricóide tende ao desequilíbrio com aumento dos fenômenos de toxicidade celular e conseqüente destruição tecidual. Neste contexto, uma analogia com as formas cutâneo-linfáticas da esporotricose pode ser sugerida. Nesta forma da micose, a intensa atividade citotóxica e enzimática é diretamente relacionada à gravidade das lesões (Morgado et al, 2011). No entanto, devido ao pequeno número de casos, estudos sistemáticos envolvendo apresentação clínica atípica da LTA são raros ou mesmo ausentes, na dependência do tipo de apresentação, impedindo a melhor caracterização da patogenia da infecção. 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. Para tal tem se lançado mão de vários marcadores celulares e funcionais que, pela sua distribuição e concentração podem traçar um perfil da reação inflamatória local ou mesmo da resposta específica sistêmica.

1.3 MARCADORES DE PERFIL CELULAR E INFLAMAÇÃO

Segundo conhecimento prévio da composição e características do infiltrado inflamatório na LTA, alguns tipos celulares têm sido apontados como sendo de grande importância na organização da resposta imune *in situ*. Destas, as de maior destaque seriam os linfócitos T e B, macrófagos e neutrófilos. Felizmente estas células podem ser detectadas através de marcadores específicos que tem escala no estudo de neoplasias, colagenoses e doenças infecciosas entre outras.

Os linfócitos T são células da resposta imune adaptativa, formados no timo. Eles se dividem classicamente em linfócitos T auxiliares ou *helper*, linfócitos T citotóxicos e linfócitos T supressores, mas outras subpopulações têm sido descritas como Th3, Th17 (Abbas & Lichtman, 2005). Todos eles possuem receptores TCR e CDR 3 e juntamente com cadeias de proteína ζ fazem a transdução de sinais bioquímicos desencadeados pelo reconhecimento de antígenos (Abbas & Lichtman, 2008). A ativação dos linfócitos depende da interação TCR:CD3:antígeno e do coestimulador IL-1, o qual resulta na ativação da transcrição de genes para citocinas, como a IL-2. CD4 e CD8 são glicoproteínas transmembranares de células T que se ligam a regiões não polimórficas das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). CD4 está presente nas células T auxiliares e reconhece seletivamente moléculas do MHC) classe II associadas a antígenos, sendo produzido por macrófagos e linfócitos B, enquanto os linfócitos T citotóxicos possuem receptores de membrana CD8, que têm a função de reconhecer o MHC-classe I. (Abbas & Lichtman, 2008).

A molécula CD22 é um marcador para linfócitos B e participa da regulação deste tipo celular, via sinalização transmembranar, em resposta a antígenos estranhos (Abbas & Lichtman, 2008).

CD68 é uma glicoproteína transmembranar altamente glicosilada, localizada principalmente nos lisossomos. Está presente em macrófagos e apresenta função ainda desconhecida (Abbas & Lichtman, 2005).

Vários artigos já demonstraram que linfócitos T e macrófagos são as células predominantes do infiltrado inflamatório das lesões de LTA e que sua

proporção e grau de ativação estão relacionados ao tipo de resposta imune (Morgado et al, 2008; Morgado et al, 2010, Moura et al, 2010; Palmeiro et al, 2012).

CD1a é uma proteína transmembrana capaz de apresentar antígenos lipídeos e glicolipídeos de origem microbiana às células T presentes nas células dendríticas. (Park et al, 2000). Estas células podem ser observadas em tecido normal, mas são evidentes tanto nas lesões cutâneas quanto mucosas da LTA (Morgado et al, 2008, Palmeiro et al, 2012). Amprey (2004), mostrou que o protozoário *Leishmania donovani* inibe a expressão de CD1 e impede a ativação das células T por células dendríticas. Isto pode representar uma estratégia de sobrevivência de *Leishmania* spp para evitar o reconhecimento abundante de glicolipídeos do parasita.

Os neutrófilos são células polimorfonucleares efetoras do sistema imune inato, que são produzidas na medula óssea e que, pela interação com monócitos, células dendríticas, células T e células B, através do contato célula a célula ou por produtos secretados, coordenam a resposta inflamatória envolvendo a defesa do hospedeiro, a fagocitose de microorganismos e a reparação de tecidos durante uma infecção. (Nathan, 2006, Novais et al., 2009). Podem ser detectadas através de marcadores enzimáticos como a elastase neutrofílica e algumas metaloproteases. Neutrófilos mostraram-se responsáveis pelo controle de infecções de diversos patógenos tais como *Legionella* spp, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium* spp, *Entamoeba histolytica*, *Histoplasma* spp, *Cryptosporidium* spp e *Leishmania* spp. (Novais et al., 2009). No entanto, na leishmaniose, neutrófilos tem sido implicado tanto no controle quanto na facilitação da infecção (Laskay Van Zandbergen & Solbach, 2008; Ritter Frischknecht & Van Zandbergen, 2009). A predominância de um ou outro efeito poderia ser função do tipo de parasita e/ou das características da resposta imune do hospedeiro. Em estudo realizado com camundongos BALB/c infectados na orelha com *L. braziliensis*, a análise histológica das lesões cutâneas no local da inoculação mostrou um constante recrutamento de neutrófilos ao local. Como este modelo experimental curou espontaneamente, os autores afirmaram a existência de um efeito protetor exercido pelos neutrófilos. No mesmo estudo, observou-se que durante a infecção com *Leishmania* o desenvolvimento das lesões coincide com a chegada de células

inflamatórias, como macrófagos, eosinófilos e neutrófilos. (Novais et al., 2009). Este dado já havia sido anteriormente descrito por Belkaid et al (2002) no modelo de infecção murina com *Leishmania major*.

NETs (“Neutrophil extracellular traps”, redes/armadilhas extracelulares neutrofilicas) são estruturas extracelulares compostas principalmente por cromatina e proteínas específicas dos grânulos de neutrófilos. As NETs são formadas após ativação, seguida pela morte de neutrófilos por IL-8, lipopolissacarídeos (LPS), bactérias, fungos ou ativação de plaquetas. (Brinkmann & Zychlinsky, 2007). Este padrão de ativação pode envolver diferentes receptores tais quais receptores *Toll-like* (TLRs), bem como citocinas e receptores para a região constante de anticorpos (Fc). Essa formação é um processo ativo que envolve o rearranjo da arquitetura nuclear e granular. Observações microscópicas mostraram que algumas bactérias e fungos se ligam a NETs e, apesar dos mecanismos envolvidos serem pouco conhecidos, essa interação apresenta uma ação antimicrobiana tão eficaz quanto a dos neutrófilos íntegros. A identificação de formação de NETs na presença de leishmanias já foi verificada em estudo *in vitro* (Guimarães et al, 2009) e *in vivo* (Morgado et al, manuscrito em preparação).

O óxido nítrico (NO) é formado a partir da L-arginina por uma das três isoformas da óxido nítrico sintase. O NO regula a resposta inflamatória, agindo como uma molécula efetora da citotoxicidade dos macrófagos contra parasitas invasores. (Bogdan et al, 2001; Serarslan & Atik, 2005). A óxido nítrico sintase do tipo 2 (NOS2) ou óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é uma enzima celular produzida principalmente por macrófagos e outros tipos celulares (Facchetti et al, 1999), sendo expressa em um amplo espectro de doenças inflamatórias (Bogdan et al, 2001). Estudos mostram que, a expressão da NOS2 e a geração de NO em resposta a IFN- γ e ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são importantes no controle da infecção em diferentes espécies de *Leishmania* (Serarslan & Atik, 2005; Morgado et al, 2008). Além disso, em estudos recentes, a expressão da NOS2 foi demonstrada em pacientes com leishmaniose cutânea apresentando uma correlação inversa entre esta expressão e o número de parasitas mortos. (Serarslan & Atik, 2005; Morgado et al, 2008). Para Bogdan et al (2001), o NO e seus derivados não atuam somente como moléculas efectoras antimicrobianas diretas, mas também

exercem um efeito imunorregulatório protetor para o hospedeiro, tal como inibição da fibrose tecidual e o término da resposta imune pela apoptose de células TCD4⁺ ativadas.

Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) pertence a uma família de genes responsáveis pela manutenção do equilíbrio entre proliferação e morte celular programada (Korsmayer, 1992). A expressão da proteína codificada pelo gene Bcl-2 tem sido identificada em uma ampla variedade de tecidos humanos, especialmente em células epiteliais de tecidos glandulares, sujeitos a hiperplasia ou involução por estímulo hormonal, como: mama, próstata e tireóide (Derossi et al, 2003). Sendo assim, Bcl-2 é utilizada como marcador preditivo de fator prognóstico e terapêutico em diversos tipos de cânceres. Segundo Fan et al. (2005), os membros da família Bcl-2 formam um grupo de fatores regulatórios da apoptose, exercendo um efeito protetor em diversos tipos de célula, tanto de modo direto, através do bloqueio dos complexos de caspases, quanto indireto, impedindo a liberação para o citoplasma de componentes da mitocôndria, capazes de ativar a caspase 3. A importância da apoptose das células do sistema imune na resolução da leishmaniose já foi demonstrada (Conceição-Silva et al, 1998) e a presença e correlação de Bcl2/Bax na atividade das lesões já foi verificada (Morgado et al, 2008; Morgado et al, 2010).

Outras moléculas ligadas com a indução de apoptose são Fas ligand (FasL, CD95L) e Fas (CD95). FasL e Fas são proteínas transmembranas do tipo 2 que pertencem à família TNF (Fator de Necrose Tumoral) (Starling et al, 1997). Segundo Oishn et al. (1996) a apoptose mediada por estas moléculas pode exercer papel importante no "turnover" e diferenciação celular na pele normal, na regulação imune de tumores e na patogênese de várias doenças de pele. A ligação entre o receptor Fas da célula-alvo e o FasL no linfócito T citotóxico desencadeia reações em cascata levando a ativação de caspases (Barry & Bleackley, 2002). Formas de Fas se ligam a sinalizadores e se internalizam na célula por via endossomal. Inicialmente ocorre a ativação da caspase-8, sendo então liberada para o citoplasma onde ativa outras caspases, ou leva a clivagem de proteínas pro-apoptóticas da família BCL-2 e a translocação do BID – *BH3 interacting-domain death agonist*, membro pro-apoptótico da família de proteínas Bcl-2; e do BAX – *Bcl-2-associated X protein*, proteína da família gênica Bcl-2, para a mitocôndria. Ambos os eventos

ativam a caspase-3 levando à morte celular por degradação do DNA (Schneider et al, 1997; Barry & Bleackley, 2002). A correlação entre Fas/FasL e a atividade inflamatória tem sido discutida principalmente em relação ao processo de cicatrização (Conceição-Silva et al, 1998).

Ki67 consiste em uma proteína nuclear associada à proliferação celular. Esta proteína está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas está ausente nas células em repouso (G0) (Schonk et al, 1989). Sendo assim, funciona como um excelente marcador para determinar a fração de crescimento de uma determinada população celular, sendo muito utilizada como fator prognóstico e diferencial de alguns tipos de cânceres (Pich et al, 2004). Em trabalho recente Morgado et al (2008), mostraram a presença significativa dessa proteína em lesões de LTA e observaram uma correlação positiva entre Ki67 e CD4⁺ sugerindo que as lesões estão em proliferação. Além disso, encontrou uma correlação positiva entre a expressão de Ki67 e Bcl-2, o que está de acordo com um ambiente de proliferação celular e proteção contra apoptose. Em artigo posterior foi ainda demonstrada a diminuição da expressão de Ki67 durante o processo de cura das lesões (Morgado et al, 2010).

Todos estes marcadores podem ser utilizados como forma de caracterizar a resposta imune localizada nos sítios da lesão, e o balanço entre eles pode demonstrar o predomínio de ações inflamatórias ou não na organização do processo inflamatório e, conseqüentemente, na evolução da infecção.

2 JUSTIFICATIVA

No intuito de compreender melhor a evolução das lesões de LTA para a forma esporotricóide, em especial o papel da resposta imune celular na determinação desta apresentação clínica peculiar, identificamos aspectos clínicos e laboratoriais e estudamos o comportamento imunológico *in situ* destes pacientes, comparando os resultados obtidos com os de pacientes que apresentam forma clínica cutânea típica de LTA.

A partir da observação clínica da existência de pacientes com lesões do tipo esporotricóide entre os casos de LTA diagnosticados no ambulatório do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (Lab Vigileish) do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e devido à dificuldade de diagnóstico diferencial conclusivo com casos de esporotricose na forma cutâneo-linfática, consideramos a possibilidade de realizar um estudo comparativo entre os resultados laboratoriais da rotina diagnóstica e a evolução clínica dos casos de LTA típica (lesão cutânea com bordas elevadas e fundo granuloso) e atípica na forma esporotricóide (LE). Este estudo se torna importante devido à escassez de informação e à necessidade do diagnóstico diferencial com a esporotricose.

A comparação dos resultados obtidos nos grupos de apresentação típica e atípica da LTA (LE) poderia evidenciar possíveis diferenças entre eles, proporcionando uma maior facilidade de diagnóstico e conseqüentemente do manejo dos pacientes com LE. A correlação com dados já existentes na literatura (Morgado et al, 2011; Barros, Paes & Schubach, 2011) poderia ainda gerar informação que auxiliasse no diagnóstico diferencial com a esporotricose.

Partindo do conhecimento prévio da importância da resposta imune celular *in situ* na evolução das lesões de LTA e na crescente possibilidade de manejo da resposta imune em imunoterapias coadjuvantes, é importante a caracterização dos fatores que apresentam papel na evolução clínica destas lesões. Isto seria particularmente interessante, principalmente se detectados fatores que modificam a evolução das formas típicas cutâneas localizadas para lesões atípicas e para lesões mais graves de difícil diagnóstico e tratamento. Além do mais a caracterização de possíveis marcadores do desenvolvimento

da lesão pode, em médio prazo, levar ao desenvolvimento de novas formas de tratamento. Por último, a caracterização da arquitetura da resposta inflamatória *in situ* pode também indicar características que permitam o auxílio ao diagnóstico presuntivo nos casos em que o agente etiológico não pode ser evidenciado e os indivíduos infectados têm história compatível tanto com LTA quanto esporotricose.

Espera-se que este conhecimento auxilie no estabelecimento de parâmetros clínicos e imunológicos que possam facilitar o diagnóstico e manuseio clínico dos pacientes com a forma esporotricóide da LTA, além de criar subsídios para o diagnóstico diferencial com a esporotricose na sua forma cutâneo-linfática. Todo o conhecimento gerado poderia ainda colaborar para um melhor conhecimento do comportamento da enfermidade.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Comparar os parâmetros clínicos, laboratoriais e da resposta imune celular *in situ* dos pacientes apresentando forma esporotricóide da LTA com casos apresentando lesão típica de LTA, visando à detecção de características específicas da forma clinica esporotricóide.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Descrever as características clínicas (sexo, idade, procedência de área endêmica, tempo de evolução, área afetada e resposta ao tratamento) nos pacientes com apresentação típica e esporotricóide de leishmaniose tegumentar americana.

2- Comparar as características clínicas, epidemiológicas e os resultados dos exames laboratoriais por ocasião do diagnóstico (intradermoreação de Montenegro – IDRM; reação de imunofluorescência indireta – RIFI, e/ou reação imunoenzimática - ELISA para *Leishmania* spp; cultura e “imprint” de fragmento de lesão para *Leishmania* spp e exame histopatológico).

3- Caracterizar a resposta imune celular *in situ* por imunohistoquímica nas lesões ativas de LTA com forma esporotricóide.

4- Comparar os resultados *in situ* obtidos nas lesões esporotricóides com aqueles obtidos nas lesões cutâneas típicas de LTA.

5- Correlacionar os achados com os dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos nos dois grupos de estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SELEÇÃO DE PACIENTES

O estudo foi realizado entre pacientes com leishmaniose tegumentar americana, diagnosticados e acompanhados no ambulatório do Lab VigiLeish entre janeiro de 2004 e dezembro de 2010, que aceitaram participar do projeto após a leitura, compreensão e assinatura do “termo de consentimento livre e esclarecido” (anexo 1), protocolos nº 014/2002 e 0016.0.009-02. No presente formato este estudo foi revalidado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC (CEP-IPEC) com o número 0056.0.009.000-10 (anexo 2). O trabalho foi dividido em duas etapas, a primeira foi a análise clínica e laboratorial e a segunda o estudo de características imunohistoquímicas.

Considerou-se forma cutânea típica aquela apresentando uma ou mais úlceras bem definidas, com bordas elevadas e fundo granuloso, não contínuas, sem a presença de linfangite nodular centrípeta, além de apresentarem exames laboratoriais comprobatórios de LTA. A LTA Esporotricóide foi definida pela presença de úlcera com gomas ou nódulos ao longo do trajeto linfático.

4.2. ANÁLISE CLÍNICA: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS PARÂMETROS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E DE RESPOSTA AO TRATAMENTO NOS PACIENTES COM APRESENTAÇÃO CUTÂNEA TÍPICA E ESPOROTRICÓIDE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.

Foi realizado o levantamento dos casos de LTA cutânea diagnosticados no Lab VigiLeish no período de estudo, sendo formados dois grupos: LE - pacientes com diagnóstico clínico de LTA na forma esporotricóide (n=23); LC - pacientes com diagnóstico de LTA na forma cutânea típica (n=471). Foi considerado como critério de inclusão o diagnóstico firmado de LTA cutânea no período do estudo por parâmetros clínicos, epidemiológicos e/ou de confirmação parasitológica. Foram excluídos deste estudo, pacientes que não

preenchiam os critérios de inclusão, os que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e um paciente com leishmaniose difusa anérgica.

As informações foram coletadas inicialmente no banco de dados construído através do programa “Access for Windows” (Microsoft, USA) e mantido sob a responsabilidade dos Drs. Maria Inês Fernandes Pimentel e Armando de Oliveira Schubach. Em caso de falta de anotação ou dúvida de preenchimento, as informações foram verificadas no prontuário do paciente mantido sob responsabilidade do Serviço de Estatística e Documentação (SED) – IPEC. Foram considerados os seguintes parâmetros: procedência, idade, sexo, tempo informado de evolução da lesão antes do diagnóstico, aspecto clínico das lesões, evolução clínica pós tratamento (resposta terapêutica) e resultados obtidos nos exames laboratoriais levados a termo por ocasião da investigação diagnóstica nestes pacientes. Tais exames compreenderam: sorologia para *Leishmania* spp, a saber: reação de imunofluorescência indireta (RIFI), e ensaio imunoenzimático (ELISA); intradermorreação de Montenegro (IDRM); cultura e “imprint” para *Leishmania* spp de fragmento de biópsia; exame histopatológico; escarificação de lesão para pesquisa de *Leishmania* spp.

A idade foi analisada de maneira contínua e posteriormente agrupada em 03 categorias: menores de 25 anos, de 25 a 44 anos, e maiores de 44 anos.

O tempo de evolução prévio ao diagnóstico foi também analisado de maneira contínua e posteriormente agrupado em duas categorias: menor ou igual há 03 meses, e maior que 03 meses, como anteriormente descrito para lesões recentes e tardias, respectivamente (Morgado et al, 2008).

A ocorrência de lesões em membros superiores foi considerada quando eram exclusivamente nesta localização ou nesta localização e em outra localização adicional, excluindo membros inferiores. Do mesmo modo, a ocorrência de lesões em membros inferiores foi considerada como tal, com lesões exclusivamente nesta localização ou nesta localização e em uma outra localização adicional, excluindo membros superiores. O termo ‘outras localizações’ foi considerado quando existiam lesões em outras áreas, exceto

membros superiores e inferiores, ou quando as lesões coincidiam em membros superiores e inferiores.

A evolução clínica pós tratamento (resposta terapêutica) foi considerada como cura, com evolução favorável até a cicatriz definitiva; ou insucesso terapêutico precoce, quando da ocorrência de falha terapêutica ou insucesso terapêutico tardio, quando do surgimento de lesões após aparente cura.

A IDRМ foi analisada de maneira contínua, e posteriormente agrupada em duas categorias: negativo (0 a 4 milímetros), e positivo (igual ou maior que 5 mm).

As sorologias para *Leishmania* spp e a cultura para *Leishmania* spp foram consideradas positivas ou negativas. O exame histopatológico foi utilizado para identificar o tipo de infiltrado inflamatório e também foi analisado como positivo ou negativo respectivamente conforme a identificação de parasitas no tecido ou não.

4.2.1 Análise estatística do estudo clínico

Os dados obtidos foram tabulados em banco de dados próprio e comparados para a detecção de possíveis diferenças entre os dois grupos estudados. Foi feita análise descritiva com medidas de tendência central e dispersão para as variáveis contínuas e medidas de proporção para as variáveis categóricas. As variáveis de estudo foram analisadas utilizando-se o Qui-Quadrado e o teste exato de Fisher, bem como regressão logística. Utilizou-se o programa de *software* Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 16.0 (SPSS Inc, USA).

4.3. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA: ESTUDO COMPARATIVO DOS PARÂMETROS DE RESPOSTA IMUNE *IN SITU*, IDENTIFICADOS NOS PACIENTES COM APRESENTAÇÃO TÍPICA E ATÍPICA ESPOROTRÍCIDO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.

A partir dos grupos formados no estudo clínico foram examinados 15 pacientes com a apresentação clínica esporotricóide e 30 pacientes com a apresentação clínica típica da LTA pareados por sexo e idade. Os critérios de inclusão foram: A - pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana que apresentaram, além da lesão cutânea, linfangite e gomas e/ou nódulos ao longo de trajeto linfático para o grupo 1 (lesão esporotricóide - LE) e pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana com lesões cutâneas típicas da enfermidade para o grupo 2 (lesão típica- LC). B - serem procedentes das áreas endêmicas do Rio de Janeiro, onde a LTA é principalmente produzida por *L. braziliensis*, C- preencherem o requisito de pareamento, D- existência de fragmentos de tecido de lesão criopreservados no banco de amostras do Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – FIOCRUZ, mantido sob a responsabilidade da Dra Fátima da Conceição Silva. Os critérios de exclusão foram: A- formas cutâneo-mucosas ou exclusivamente mucosas de LTA; B- LTA cutânea com mais de 10 lesões; C- extremos de idade (menores de 13 anos e maiores de 80 anos) devido às alterações fisiológicas da resposta imune; D- tratamento anterior para LTA ou em uso de drogas imunossupressoras; E- pacientes que por qualquer motivo (recusa, nível de compreensão deficitário etc.) não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido do projeto “Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz” (anexo I).

4.3.1 Coleta de material biológico

No momento do procedimento diagnóstico um fragmento de lesão foi obtido de pacientes atendidos no ambulatório do Lab VigiLeish; as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Imunoparasitologia (LIP), IOC – FIOCRUZ, para os testes de imunohistoquímica. Este procedimento faz parte do procedimento diagnóstico e não acarreta nenhuma manipulação adicional do paciente. Os fragmentos de lesões cutâneas

criopreservados foram codificados para proteção à identificação do paciente. Os dados clínicos laboratoriais e epidemiológicos dos 45 pacientes selecionados foram estocados em bases de dados (SPSS para Windows versão 16.0, SPSS) com codificação dos pacientes para preservação de identidade. Neste grupo, os resultados do estudo *in situ* também foram avaliados em relação aos resultados dos exames laboratoriais por ocasião do diagnóstico, compreendendo sorologia para *Leishmania* spp (reação de imunofluorescência indireta e ELISA), IDRM, cultura e *imprint* para *Leishmania* spp, além de exame histopatológico.

4.3.2 Preparação dos fragmentos teciduais

Para análise do material dos fragmentos de lesões armazenados foram realizados cortes com 3 µm de espessura utilizando-se para tal aparelho de criostato (Leica, Alemanha). Os cortes foram apostos em lâminas de microscopia (silanized slides, DakoCytomation, Carpinteria, Clostrup, Dinamarca) e fixados em acetona PA (Merck, Darmstadt, Alemanha). As lâminas fixadas podiam ser utilizadas imediatamente, ou então armazenadas a -70°C.

4.3.3 Imunohistoquímica

As lâminas contendo cortes fixados foram secas à temperatura ambiente e depois hidratadas em solução de salina fosfatada tamponada (PBS) pH 7,4 – 7,6 por 10 minutos. A partir deste momento todo o procedimento foi realizado em câmara úmida. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com soro de cabra normal e após esta etapa um painel de anticorpos primários foi adicionado aos cortes para a marcação de células e função celular nos infiltrados celulares. Os anticorpos utilizados foram: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD22, anti-CD1a, anti-elastase neutrofílica e anti-CD68(Dako), anti-NOS2 (BD Transduction Laboratories, USA), anti-CD62E, anti-Bcl2, anti-Ki67

(Dako), anti-Fas e anti-FasL (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, U.S.A.), conforme listado no quadro abaixo.

CD3 – DakoCytomation	População total de linfócitos T
CD4 – DakoCytomation	Subpopulação de linfócitos T auxiliares
CD8 – DakoCytomation	Subpopulação de linfócitos T citotóxicas
CD22- DakoCytomation	Células B
CD68 – DakoCytomation	Marcador de macrófagos
NOS2 – T cell Transduction	Óxido nítrico sintase
Elastase Neutrófila – DakoCytomation	Marcador de neutrófilos
NET	Redes extracelulares neutrófilicas
DC – DakoCytomation	Célula dendríticas
CD62E – DakoCytomation	E-Selectina, marcador de endotélio
Ki67 – DakoCytomation	Indicador de proliferação celular
Bcl-2 – DakoCytomation	Inibidor de apoptose
CLA – BD Pharmigem	Antígeno Leucócito Cutâneo
Fas – BD Pharmigem	Receptor para o ligante Fas
FasL – BD Pharmigem	Fas Ligante (indutor de apoptose)
CD1a – DakoCytomation	Célula de Langerhans

Ao término da incubação os cortes foram lavados em PBS para retirada do anticorpo não fixado e as lâminas foram incubadas numa seqüência de lavagens e incubações com anticorpo secundário biotilado (Zymed Laboratories Inc., U.S.A), kit de marcação enzimática contendo streptavidina peroxidase (kit Dakocytomation) e kit de revelação AEC (Zymed). Por último as lâminas foram contracordadas com hematoxilina de Mayer (Dako) e cobertas com solução de montagem (Dakocytomation) e lamínula. A leitura das lâminas

em microscópio óptico (Zeiss, Alemanha) se deu pela contagem percentual das células marcadas, utilizando-se como padrão a contagem de 500 células ou 10 campos se necessário. Em alguns casos, utilizou-se lamínula milimetrada para o cálculo do infiltrado inflamatório por mm^2 de tecido.

Para a detecção dos parasitas foi usado anticorpo primário de coelho anti-*Leishmania* spp, gentilmente cedido pela Dra. Maria de Fátima Madeira (IPEC-FIOCRUZ) e anticorpo secundário biotinilado de cabra anti Ig de coelho. Todas as outras etapas foram idênticas.

A intensidade das marcações de NOS2 foi determinada da seguinte forma: discreto (1 área positiva por campo 20x), moderado (2 a 3 áreas positivas por campo), intenso (3 a 4 áreas positivas por campo) e muito intenso (5 ou mais áreas positivas por campo)

Todas as lâminas foram fotografadas e estocadas em banco de imagem para verificação e comparação da qualidade do material e posterior análise porventura necessária. Para tal utilizou-se microscópio acoplado a aparelho fotográfico (Nikon, Japão) e computador (Dell, USA).

4.3.4 Análise estatística do estudo *in situ* por imunohistoquímica

Foi construído banco de dados específico para o estudo *in situ* utilizando-se o software SPSS para Windows versão 16 (SPSS Inc.).

Foi realizada análise descritiva com medidas de tendência central e dispersão para as variáveis contínuas e medidas de proporção para as variáveis categóricas.

A análise dos resultados de imunohistoquímica foi feita pela análise de amostras não relacionadas através do teste não-paramétrico Mann – Whitney para comparação de lesões esporotricóides com aquelas ditas típicas.

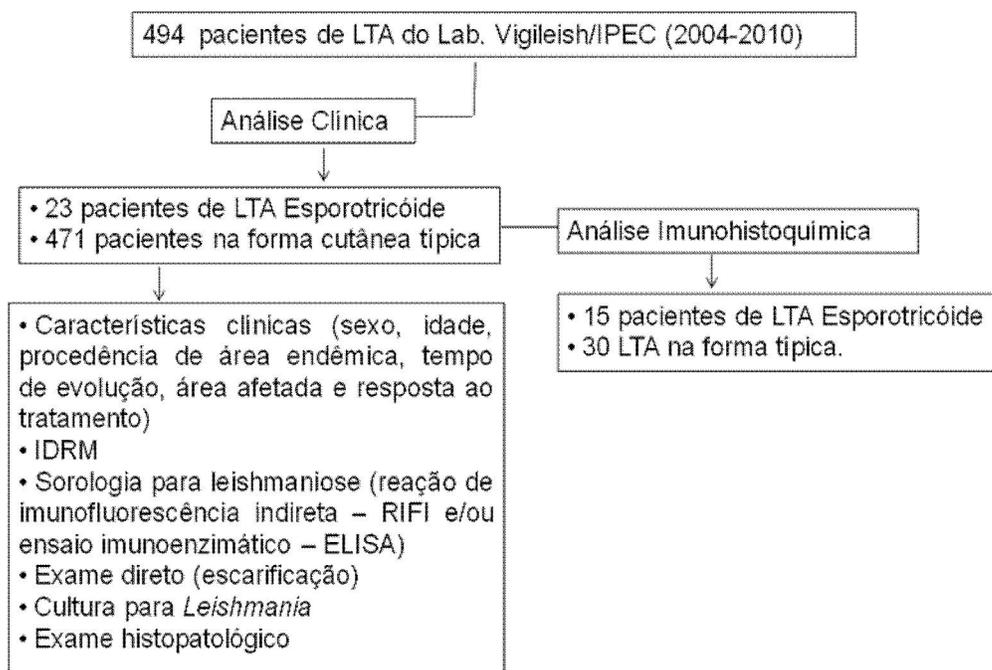
Foram comparados os parâmetros epidemiológicos e de resultados de exames laboratoriais, inclusive os resultados dos estudos imunológicos *in situ*, utilizando-se a correlação por postos de Spearman, quando aplicável.

Os dados foram apresentados em distribuição como média \pm SEM (erro mínimo). Os resultados não numéricos foram analisados em tabelas de

contingência 2 x 2 através do teste exato de Fischer do programa INSTAT (Graphpad Software V2-04 Graphpad Instat TM).

5. RESULTADOS

O estudo foi dividido em duas etapas como descrito no fluxograma a seguir:



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

Dos pacientes atendidos no Lab Vigileish entre janeiro de 2004 e dezembro de 2010, 494 pacientes preenchem os critérios de inclusão no estudo, e destes 23 tiveram diagnóstico de forma esporotricóide (LE) da enfermidade (4,7% do total).

Quatorze (60,9%) pacientes com LE eram do sexo feminino. No grupo LE, a média de idade foi de 44,74 anos, variando entre 13 e 80 anos. A análise dos parâmetros clínicos dos pacientes LE demonstrou que em 22 pacientes (não pudemos obter esta informação em um paciente) o tempo médio de evolução antes do diagnóstico foi de 2,55 meses, variando de 1 a 12 meses; entretanto, 20 (90,9%) pacientes tiveram tempo de evolução igual ou menor

que 3 meses. Doze pacientes (52,2%) tiveram lesões localizadas em membros superiores, embora localizações cefálicas, no pescoço, tronco ou membros inferiores também tenham ocorrido; houve diferença estatisticamente significativa, em comparação com o grupo LC ($p = 0,037$, teste exato de Fisher). Seis destes pacientes abandonaram seguimento; dos restantes, 12 (70,6%) responderam satisfatoriamente ao primeiro tratamento, e cinco tiveram insucesso terapêutico tardio, com boa resposta a retratamento subsequente com antimoniato de meglumina ou anfotericina B.

Dos 471 pacientes que apresentaram lesões cutâneas típicas de LTA (LC) (95,3% do total), 167 (35,5%) eram do sexo feminino. A distribuição entre os sexos foi considerada significativamente diferente entre os dois grupos (p valor = 0,024, teste exato de Fisher). A média de idade dos pacientes com LC foi de 35,94 anos. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos LE e LC com relação à idade ($p = 0,032$, regressão logística). Cento e setenta e nove (38%) dos pacientes com LC tinham lesões em membros inferiores, diferindo significativamente dos pacientes com LE ($p = 0,048$, teste exato de Fisher). Na comparação entre os grupos LE e LC, o tempo de evolução e a resposta terapêutica não demonstraram diferenças significativas. Os dados acima foram resumidos na tabela 1. Os resultados dos exames laboratoriais foram semelhantes entre os dois grupos (tabela 2 e dados não demonstrados). No entanto, vale notar que, apesar de não haver nível de significância digna de nota, havia uma tendência a maior reatividade ao teste intradérmico de Montenegro no grupo LE (LE = $21,75 \pm 11,29$; LC = $18,54 \pm 12$), conforme mostrado na figura 3.

Na **tabela 2**, observamos os resultados dos exames laboratoriais dos pacientes com LE. Vinte pacientes (86,9%) tiveram cultura para *Leishmania* spp positiva, dos quais 18 foram caracterizados como *L. braziliensis*; em um caso não foi possível realizar a caracterização da espécie do parasita, e um paciente teve cultura positiva para *Leishmania* spp que, entretanto não pertence às espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*. Três pacientes tiveram cultura para *Leishmania* spp negativa.

Tabela 1 - Comparação entre os dados clínicos, laboratoriais e de resposta terapêutica dos pacientes com lesões cutâneas típicas (LC) e lesões esporotricóides (LE) de leishmaniose tegumentar americana. Lab Vigileish, IPEC, FIOCRUZ, 2004 – 2010.

COMPARAÇÃO		LE (23)	LC (471)	p-valor
Sexo	Masculino	39.1% (09)	64.5% (304)	
	Feminino	60.9% (14)	35.5% (167)	0.024^a
	Dados ausentes	0	0	
Idade (anos)	Média	44.74	35.94	
	Desvio padrão	19.010	19.073	0.906 ^b
	Mínimo	13	1	0.032^c
	Máximo	80	92	
	< 25 anos	13.0% (03)	31.8% (150)	
	25 – 44 anos	52.2% (12)	36.3% (171)	
	> 44 anos	34.8% (08)	31.8% (150)	
	Dados ausentes	0	0	
Período de evolução até o diagnóstico (meses)	Média	2.55	3.11	
	Desvio padrão	2.283	3.769	0.987 ^b
	Mínimo	1	1	
	Máximo	12	53	
	≤ 3 meses	90.9%* (20)	75.3%* (342)	
	> 3 meses	9.1%* (02)	24.7%* (112)	0.125 ^a
	Dados ausentes	01	17	
Lesões em MMSS, MMII e outras localizações [#]	Membros superiores	52.2% (12)	27.2% (128)	
	Membros inferiores	17.4% (4)	34.8% (164)	0.028^b
	Outras localizações	30.4% (7)	38.0% (179)	
Teste intradérmico de Montenegro (milímetros)	Média	21.75	18.54	
	Desvio padrão	10.992	12.008	0.266 ^b
	Mínimo	0	0	
	Máximo	50	75	
	Negativo (0-4 mm)	5%* (01)	6.3%* (26)	

	Positivo (≥ 5 mm)	95%* (19)	93.7% (384)	1.000 ^a
	Dados ausentes	03	61	
Imunofluorescência indireta	Negativo	41.2%* (07)	29.5%* (101)	
	Positivo	58.8%* (10)	70.5%* (241)	0.294 ^a
	Dados ausentes	06	129	
Ensaio imunoenzimático (ELISA)	Negativo	21.1%* (04)	11.6%* (35)	
	Positivo	78.9%* (15)	88.4%* (267)	0.266 ^a
	Dados ausentes	04	169	
Cultura para <i>Leishmania</i>	Negativo	13.0% (03)	14.2%* (57)	
	Positivo	87.0% (20)	85.8%* (345)	1.000 ^a
	Dados ausentes	0	69	
Histopatologia	Sem parasitas	52.2% (12)	42.2%* (151)	
	Com parasitas	47.8% (11)	57.8%* (207)	0.389 ^a
	Dados ausentes	0	113	
Seguimento pós-tratamento	Cura	70.6%* (12)	79.4%* (274)	
	Re-ativação	29.4%* (05)	20.3%* (70)	0.394 ^a
	Dados ausentes	06	127	

a = regressão logística; b = teste exato de Fisher; c = Qui-quadrado de Pearson. Em negrito, p-valores significativos; # MMSS – Membros superiores, MMII – Membros inferiores; Pacientes com lesões exclusivamente em membros superiores; excluindo lesões em membros inferiores; e outras localizações com ou sem lesões em membros superiores e/ou inferiores.

Tabela 2 - Resultados dos exames laboratoriais de 23 pacientes com forma esporotricóide de leishmaniose cutânea. IPEC, FIOCRUZ, 2004-2010

Pacientes	Cultura	Histopatologia	RIFI	ELISA	IDRM(mm)	Escarificação
1	POS	PIG+Amastigotas	não reator	indeterminado	50	POS
2	POS	PIG	1:40	reator	15	POS
3	POS	PIG	não reator	NR	30	NEG
4	POS	PIG+Amastigotas	não reator	não reator	17	POS
5	NEG	PIG	indeterminado	reator	18	NEG
6	NEG	PIG+Amastigotas	1:40	reator	18	POS
7	POS	PIG+Amastigotas	1:80	reator	15	NR
8	POS	PIG	NR	reator	NR	POS
9	POS	PIG	1:80	reator	23	NR
10	POS	PIG+Amastigotas	1:80	reator	22	NR
11	POS	PIG	NR	reator	10	NR
12	POS	PIG+Amastigotas	não reator	não reator	25	POS
13	POS	PIG+Amastigotas	não reator	não reator	35	NEG
14	POS	PIG+Amastigotas	1:40	indeterminado	12	POS
15	POS	PIC+Amastigotas	não reator	NR	30	NR
16	NEG	PIG	1:40	reator	23	NEG
17	POS	PIG+Amastigotas	1:160	reator	NR	NR
18	POS	PIG	1:40	reator	18	NR
19	POS	PIG+Amastigotas	1:160	reator	11	NR
20	POS	PIG	NR	reator	30	NR
21	POS	PIG+Amastigotas	NR	reator	NR	NR
22	POS	PIG+Amastigotas	1:80	NR	0	NR
23	POS	PIG	NR	reator	33	NR

NR = não realizado; RIFI = reação de imunofluorescência indireta; ELISA = ensaio imunoenzimático

IDRM (mm) = intradermoreação de Montenegro (milímetros); POS = positivo; NEG = negativo

PIG = processo inflamatório crônico granulomatoso

PIG + Amastigotas = processo inflamatório crônico granulomatoso com amastigotas

PIC + Amastigotas = processo inflamatório crônico com amastigotas

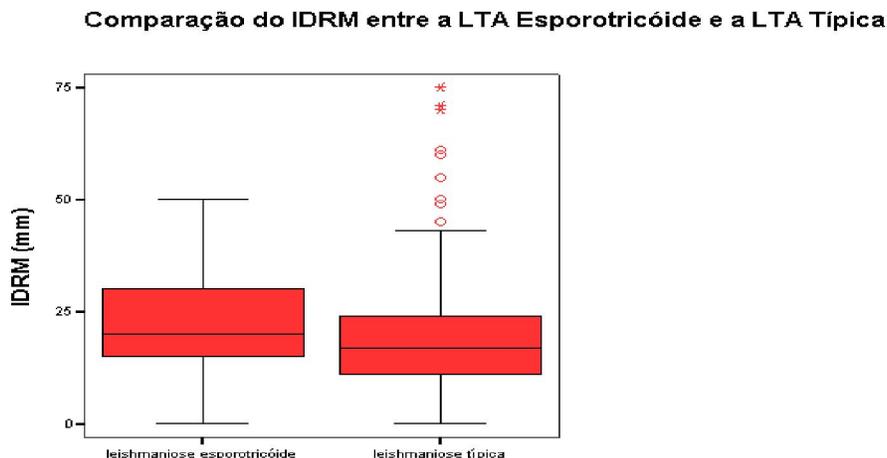


Figura 3: Comparação do IDRM (em milímetros) entre a leishmaniose esporotricóide e a leishmaniose cutânea típica.

5.2. ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE *IN SITU* NOS GRUPOS ESTUDADOS

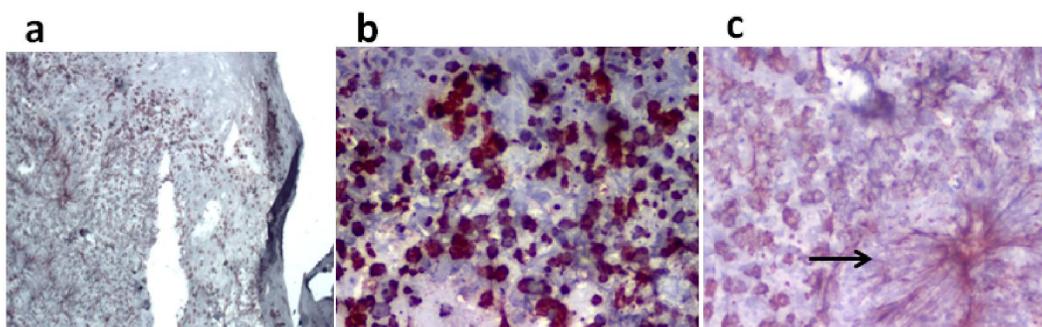
Tecidos oriundos de lesões ativas dos pacientes com forma cutânea típica (LC) e esporotricóide (LE) foram analisados por imunohistoquímica como descrito no material e métodos. Dos 15 pacientes LE, 8 eram do sexo feminino (53,3 %) e 7 do sexo masculino (46,7%), a idade variou entre 13 e 71 anos (média $43,13 \pm 18,31$). Já nos 30 pacientes LC, 16 eram do sexo feminino (53,4 %) e 14 do sexo masculino (46,6%), e a idade variou entre 14 e 70 anos (média $42,17 \pm 17,60$), não sendo verificadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos em relação à distribuição por sexo e idade, o que permitiu a comparação de dados. A IDRM foi positiva em 100% dos casos de LE, com área de induração média de $22,92 \pm 9,86$ em comparação com os casos de LC que tiveram média de $17,25 \pm 7,86$ (p valor = 0,083). Em todos os 15 casos de LE o diagnóstico foi confirmado por visualização do parasita (cultura, *imprint* e/ou histopatologia). A análise do tempo médio de evolução antes do diagnóstico foi de 1,73 meses, variando de 1 a 12 meses, para os pacientes com LE; e de média de 2,26 meses (1-17 meses) para pacientes com LC. Comparando a localização das lesões entre os dois grupos, percebeu-se uma predominância de lesões em membros superiores, não havendo diferenças

significativas entre eles. Esta distribuição indicou a eficiência do pareamento que permitiu as comparações da composição e organização do processo inflamatório.

O exame microscópico das lesões LE evidenciou presença de infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares. O infiltrado inflamatório mostrou-se intenso, e em geral havia a formação de abscessos e esboços de granulomas. Nas lesões típicas (LC) o infiltrado geralmente era difuso e com uma distribuição mais homogênea, sem presença de abscessos.

O estudo da reação inflamatória *in situ* por imunohistoquímica evidenciou nas lesões LE um predomínio de neutrófilos, distribuídos heterogeneamente na derme, variando de 9,87% a 43,23% das células (média $21,21\% \pm 9,7$), especialmente em áreas de abscesso, sendo que em alguns locais a percentagem ultrapassava 90% das células. Nos demais, os neutrófilos apresentavam-se isolados em meio ao infiltrado, algumas vezes apenas no interior de vaso. Foi observada também uma diferença na morfologia das células: nos cortes com menos neutrófilos, estes se encontravam bem compactados enquanto que naqueles com maior quantidade, este tipo celular mostrava-se com maior tamanho e conteúdo citoplasmático (figuras 4a e 4b). A quantidade de neutrófilos nas lesões LE foi significativamente maior do que nas lesões LC ($p=0,019$; tabela 3 e figura 5) que apresentavam média de $13,53 \pm 9,32$ e cuja distribuição de neutrófilos apresentava-se isolada em meio ao infiltrado inflamatório (tabela 3, figura 4d e figura 4e). A formação de NETs (neutrophil extracellular traps) foi observada em muitas lesões, principalmente nas que apresentavam percentagem de neutrófilos maior e apresentou aumento significativo em quantidade e tamanho nas lesões LE ($p = 0,018$ – tabela 3 e figuras 4c e 4f).

NEUT LTA Esporotricóide



NEUT LTA Típica

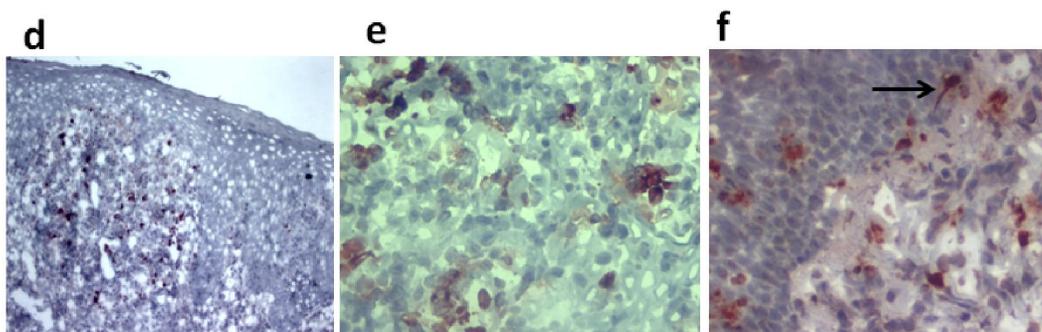


Figura 4 - Comparação da expressão de elastase neutrofílica e NET (→) em (a, b, c) lesões de LTA Esporotricóide e (d, e, f) lesões de LTA Típica. NEUT – Neutrófilos. Aumento 100x em (a, d), 400x em (b,c,e,f).

Os macrófagos CD68⁺ eram muito freqüentes (média de 42,43% ± 9,9; p=0,48) nas lesões LE e apresentavam uma distribuição homogênea por todo o infiltrado presente na derme, mas não houve diferença no padrão de distribuição entre os dois grupos. (tabela 3, figura 6).

Células de Langerhans CD1a⁺ estavam aumentadas significativamente nas lesões LE (média 18,4 ± 9,3 /mm²) com p valor = 0,011, sendo observadas tanto na epiderme, quanto na derme e nas proximidades de vasos sanguíneos. Nas lesões LC as células apresentavam-se mais na epiderme ou restritas à derme papilar, com média de 12,56 ± 13,81/mm². (tabela 3 e figura 6).

Observou-se uma diminuição significativa na concentração de Bcl-2 na LTA Esporotricóide (LE) em relação à LTA Típica (LC) ($p = 0,036$ – tabela 3, figura 5).

Tabela 3 - Contagem percentual e por mm² dos marcadores estudados nos sítios de lesões cutâneas de LTA esporotricóide (LE) em comparação à LTA típica (LC).

Células ou Marcadores Inflamatórios	LE Média (mínimo – máximo)	LC Média (mínimo - máximo)	p valor
CD3 (%)	48,00 (39,3-65,5)	52,07 (31,7-70,0)	0,189
CD4 (%)	27,99 (8,9-50,49)	35,42 (16,3-59,9)	0,083
CD8 (%)	34,13 (13,9-49,3)	30,83 (15,3-48,5)	0,273
CD22 (%)	12,53 (1,7-29,9)	18,12 (1,1-46,0)	0,657
Neutrófilos (%)	21,21 (9,8-43,2)	13,53 (0,9-37,7)	0,019
NET	5,26 (2,0-20,0)	3,56 (0,0-19,3)	0,018
Macrófagos (%)	42,42 (29,0-57,1)	40,41 (14,2-53,8)	0,48
KI67 (%)	9,23 (3,2-19,9)	10,51 (4,9-24,0)	0,446
Leishmania	1,00 (0,0-6,5)	1,06 (0,0-13,6)	0,591
Bcl 2 (%)	22,58 (2,3-40,8)	32,98 (6,7-68,4)	0,036
Fas (%)	35,92 (15,1-50,5)	38,70 (1,4-78,4)	0,478
FasL (%)	19,74 (1,8-36,64)	23,30 (9,9-36,2)	0,628
CD62E (mm²)	3,89 (1,0-8,0)	3,08 (1,0-8,0)	0,458
CD1a (mm²)	18,4 (3,0-38,0)	12,56 (0,5-56,0)	0,011

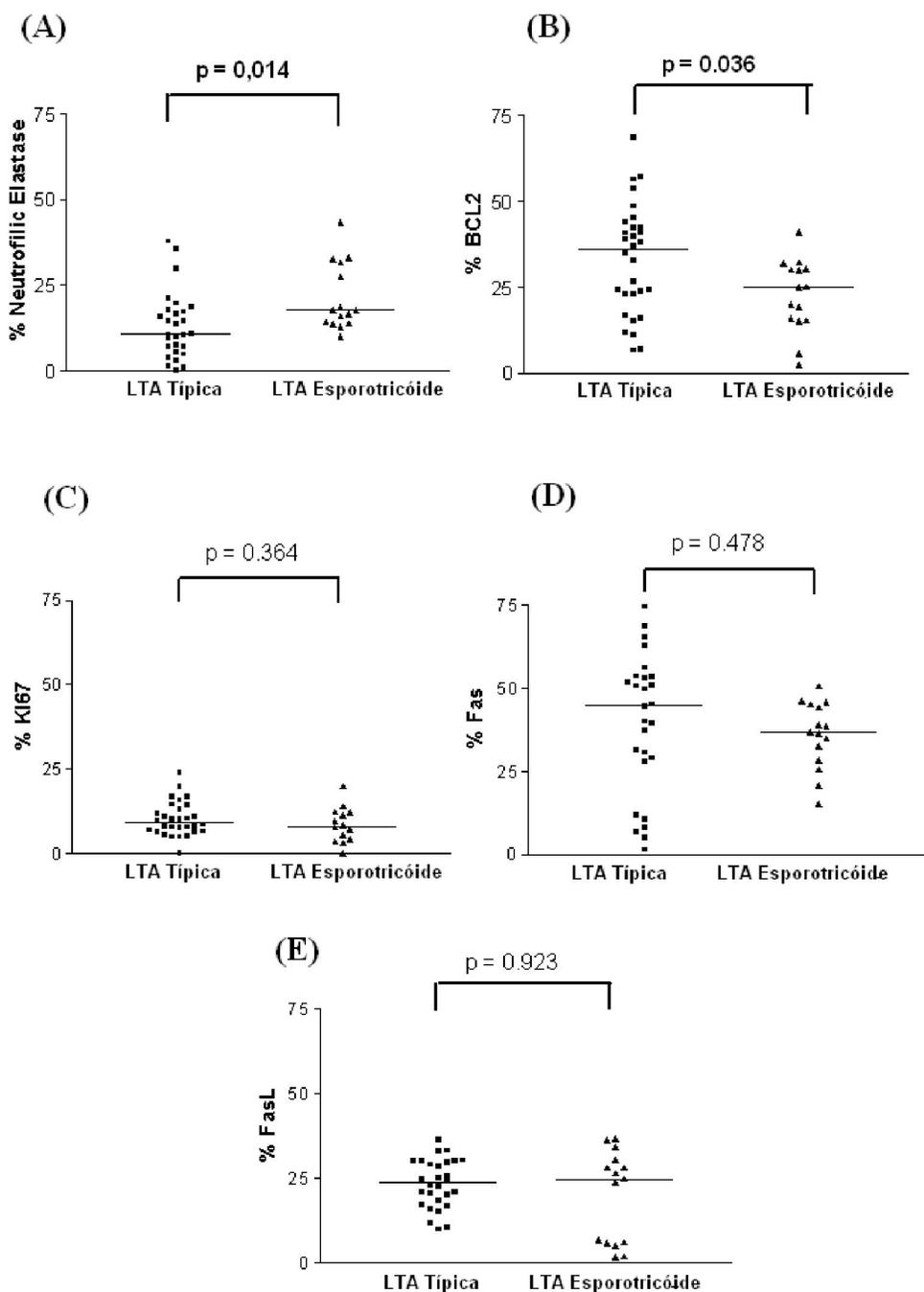


Figura 5 - Contagem percentual e por mm² dos marcadores estudados nas lesões cutâneas de LTA esporotricóide em comparação à LTA típica. (A) Elastase neutrofílica, (B) %Bcl-2, (C) %Ki67, (D) %Fas e (E) %FasL. A linha corresponde à mediana. P < 0,05 foi considerado significativo. LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana.

A distribuição de células expressando CD22, CD3, CD4, CD8, Ki-67, Fas e FasL não diferiu significativamente entre os dois grupos. Os valores percentuais encontrados estão demonstrados na tabela 3 e nas figuras 5, 6 e 7.

A expressão do NOS2 foi mais intensa nas lesões LE que nas LC ($p = 0,032$) como mostrado na tabela 4 e na figura 8b. Foi possível detectar a presença de NOS2 em todas as lesões com intensidade e distribuição variável, desde pequenos grupos de células (discreto) até distribuição difusa abrangendo todo ou grande parte do tecido (muito intenso). No entanto, o número de parasitas detectado nos dois grupos foi semelhante ($p = 0,591$ – Figura 8a). Foi possível detectar parasitas em 5 dos 13 pacientes avaliados com lesões de LE. Nos 8 pacientes em que o parasita não foi visualizado pela imunohistoquímica, a infecção foi confirmada por isolamento em cultivo. Os parasitas podiam ser encontrados no meio extracelular ou no citoplasma de células infectadas presentes no infiltrado inflamatório em derme, e menos freqüente em células na epiderme. A quantidade de parasitas nas lesões LE variou de 0 a 6,5 /mm².

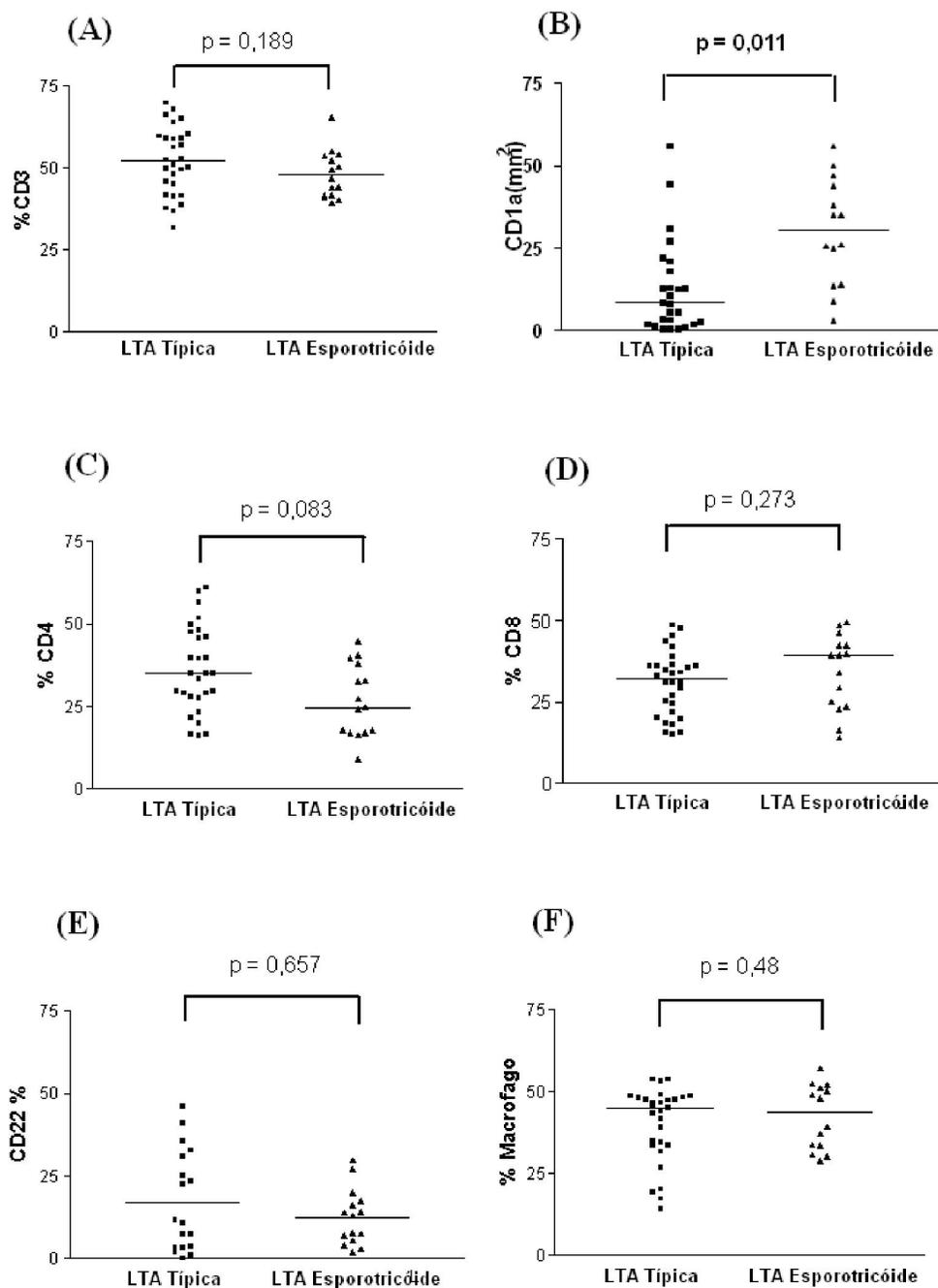


Figura 6: Contagem percentual e por mm² dos marcadores estudados nas lesões cutâneas de LTA esporotricóide em comparação à LTA típica. (A) %CD3, (B) CD1a/mm², (C) %CD4, (D) %CD8, (E) %CD22 e (F) %macrófagos. A linha corresponde a mediana. P < 0,05 foi considerado significativo. LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana.

Na figura 7 são exemplificadas algumas marcações positivas de lesões de LTA esporotricóide.

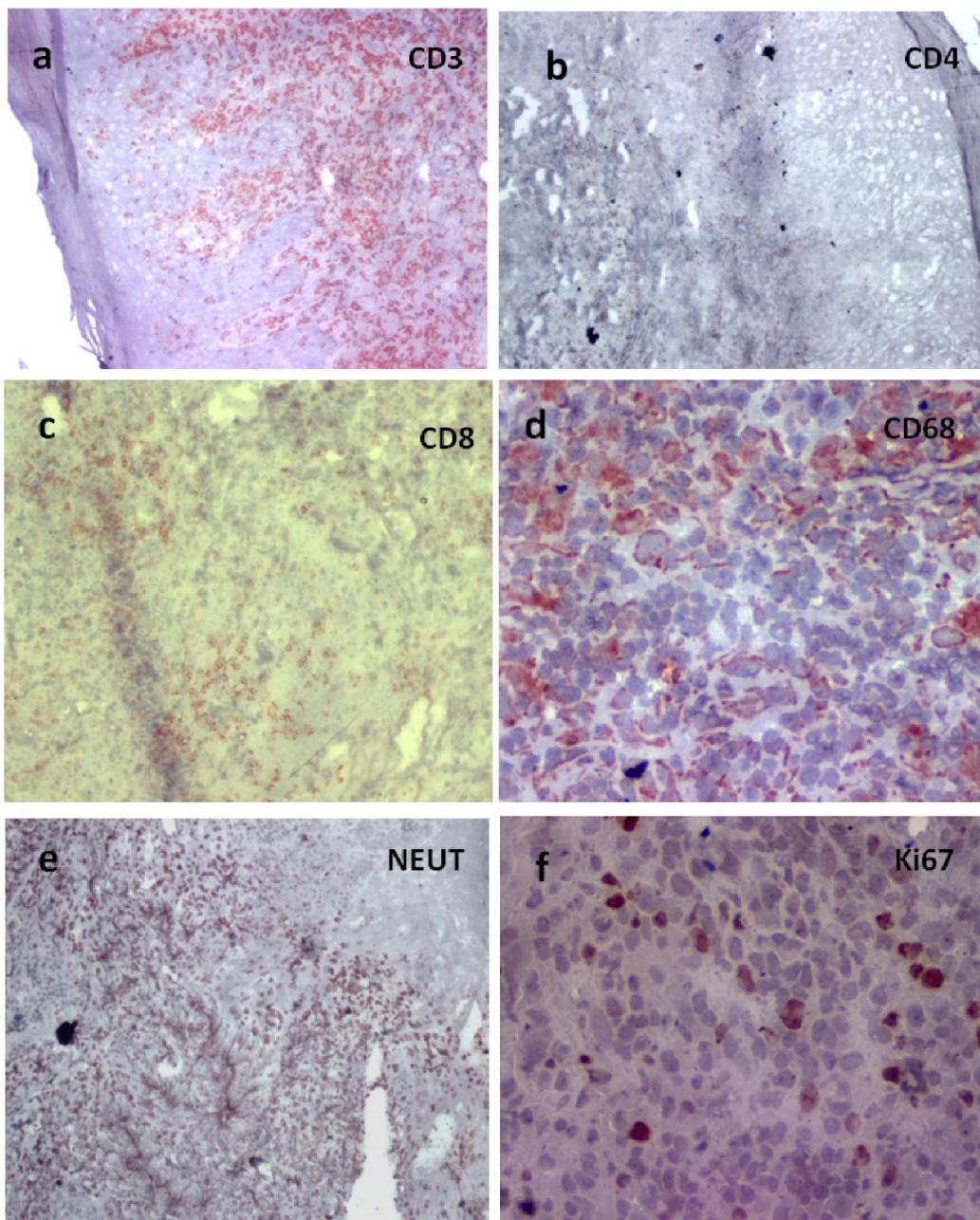


Figura 7 – Lesão de LTA esporotricóide: (a) células T CD3⁺, (b) células T CD4⁺, (c) células T CD8⁺, (d) células T CD68⁺, (e) neutrófilos, (f) células Ki67⁺. As células consideradas positivas apresentam coloração castanha-avermelhada de intensidade e distribuição variáveis, na dependência do marcador utilizado. O tecido foi contracorado com hematoxilina de Meyer que produz coloração azul-acastanhada. Aumento 400x nas fotos d e f e aumento de 100x nas demais fotos.

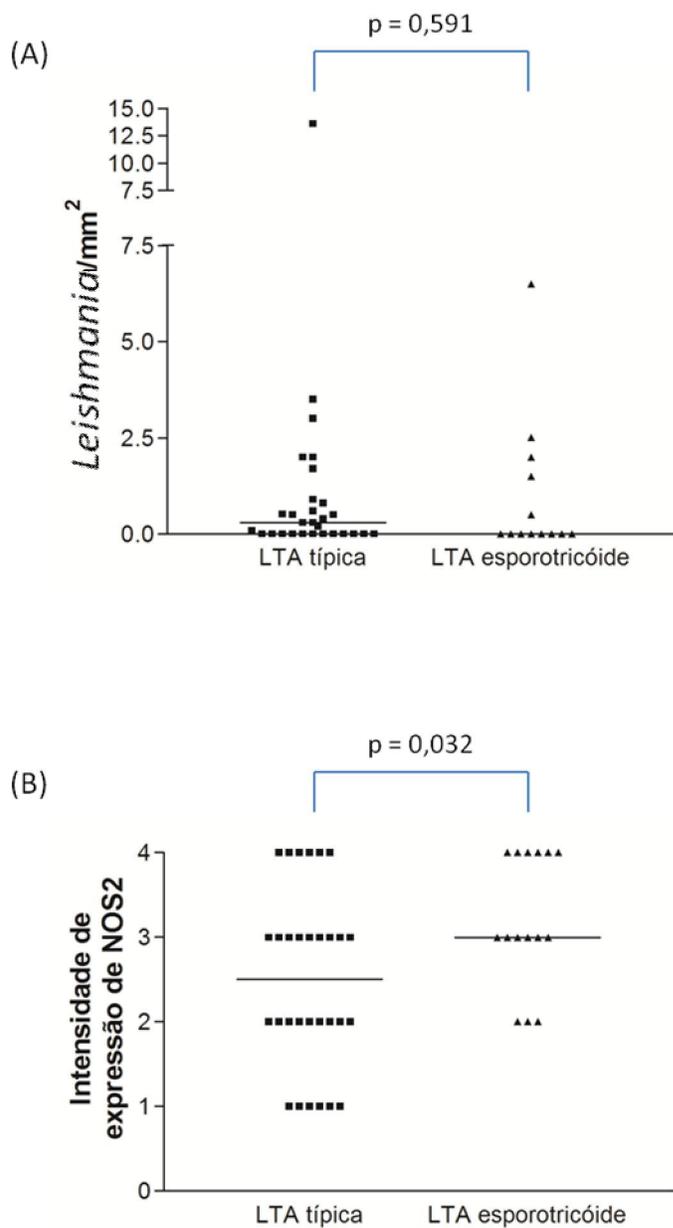


Figura 8 - Contagem percentual dos marcadores estudados nas lesões cutâneas de LTA Esporotricóide em comparação à LTA Típica. (A) *Leishmania*/mm² e (B) intensidade de expressão de NOS2. (+ (1 área positiva por campo 20x), ++ (2 a 3 áreas positivas por campo), +++ (3 a 4 áreas positivas por campo) e ++++ (5 ou mais áreas positivas por

campo)^a. A linha corresponde a mediana. $P < 0,05$ foi considerado significativo. LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana.

Tabela 4 – Comparação de intensidade da expressão da enzima Óxido Nítrico Sintase 2 entre os pacientes com LTA cutânea Esporotricóide e LTA cutânea Típica.

Tipo de Leishmaniose	Óxido Nítrico Sintase (NOS2)				Total
	+	++	+++	++++	
Leishmaniose cutânea típica (LC)	6 (20%)	9 (30%)	9 (30%)	6 (20%)	30
Leishmaniose esporotricóide (LE)	0	3 (20%)	6 (40%)	6 (40%)	15
Total	6	12	15	12	45

:a- + (1 área positiva por campo 20x), ++ (2 a 3 áreas positivas por campo), +++ (3 a 4 áreas positivas por campo) e ++++ (5 ou mais áreas positivas por campo).

6. DISCUSSÃO

Na primeira etapa deste estudo foi possível a identificação de características diferenciais entre os pacientes com a apresentação clínica atípica do tipo esporotricóide e aqueles com as lesões cutâneas típicas de LTA. Foram selecionados 23 pacientes que receberam diagnóstico de LTA esporotricóide comparando-os com 471 pacientes de LTA cutânea típica. Observamos que na leishmaniose esporotricóide houve predomínio do sexo feminino, ao contrário das outras formas de leishmaniose cutânea, em que há predomínio do sexo masculino ($p = 0,024$), o que está em concordância com os dados do Ministério da Saúde do Brasil, que relata 74% de casos de leishmaniose tegumentar em homens (Ministério da Saúde, 2010). Na recente epidemia de esporotricose ocorrida no estado do Rio de Janeiro, observa-se um predomínio da forma cutâneo-linfática no sexo feminino, assim como foi encontrado nas lesões de LTA esporotricóide. Além disso, à semelhança com a esporotricose (Morgado et al, 2011; Barros, Paes & Schubach, 2011), no grupo com leishmaniose esporotricóide, as lesões predominaram em membros superiores, enquanto no grupo com outras formas de lesões cutâneas isto não ocorreu ($p = 0,037$). Já nos pacientes com a forma cutânea típica, houve 38% de casos com lesões em membros inferiores, e somente 17,4% dos pacientes com a forma esporotricóide apresentaram lesões nesta localização ($p = 0,048$). Na análise por regressão logística, os pacientes com apresentação esporotricóide apresentaram idade mais avançada que os pacientes com outras formas cutâneas ($p = 0,032$). As demais características clínicas e o seguimento pós-tratamento foram semelhantes para os dois grupos estudados. Em conjunto os dados deste trabalho e os já publicados sugerem que os parâmetros clínicos e epidemiológicos dos pacientes de forma esporotricóide da LTA são semelhantes aos observados nos casos de esporotricose observados na mesma região. Estudos comparativos atualmente em andamento estão investigando hipóteses que possam explicar tais semelhanças.

No presente trabalho foi possível a verificação de diferenças significativas entre as características clínicas, laboratoriais e de organização do infiltrado inflamatório entre a forma esporotricóide e a forma típica das lesões cutâneas de LTA.

A variante esporotricóide da leishmaniose cutânea é definida pela presença de lesão de inoculação primária associada a nódulos dérmicos e hipodérmicos ao longo do cordão linfático (Ejaz Raza & Iftikhar, 2007, Iftikhar Bari & Ejaz, 2003; Masmoudi et al, 2008), que podem ulcerar, lembrando a apresentação clínica mais comum da esporotricose, a forma cutâneo-linfática.

No Rio de Janeiro a forma esporotricóide de leishmaniose torna-se importante, pois a esporotricose é uma zoonose emergente no Rio de Janeiro, com prevalência ascendente desde a década de 90 (De Lima Barros et al, 2001; De Lima Barros et al, 2005). Neste estado, casos de linfangite nodular, associados ou não a úlcera de inoculação, induzem a pensar na esporotricose como principal hipótese diagnóstica. No entanto, devemos ter em mente que outros agentes podem causar quadros similares, como: *Nocardia brasiliensis*, *Mycobacterium marinum* ou *Leishmania braziliensis* (Tobim, 2001). A LTA é o diagnóstico diferencial principal no Rio de Janeiro, porque as áreas de ocorrência das duas infecções são parcialmente superpostas (Barros et al, 2004). Devido a isto, muitos pacientes podem ser erroneamente diagnosticados e inadequadamente tratados (Iftikhar Bari & Ejaz, 2003; Bari & Rahman, 2006).

Deste modo, considerando-se a prevalência de LTA no país (Ministério da Saúde, 2010), ela deverá ser levada em conta no diagnóstico diferencial de lesões atípicas que não respondem aos tratamentos convencionais com antibióticos ou antifúngicos. A avaliação clínica isolada pode ser insuficiente para o diagnóstico diferencial entre esporotricose e LTA, sendo necessária a realização de biópsia e outros exames complementares, para a demonstração de formas amastigotas no tecido ou isolamento do parasita em cultura do material obtido das lesões tegumentares (de Lima Barros et al, 2005).

Neste sentido, comparar características clínicas, laboratoriais e evolutivas de pacientes de LTA esporotricóide com pacientes de LTA cutânea típica, e posteriormente correlacionar os dados da resposta imune celular *in situ* dos pacientes apresentando forma esporotricóide com os casos de lesão

típica (lesão ulcerada de bordas elevadas e fundo granuloso) de LTA, poderia auxiliar no manejo destes pacientes.

Observamos que os pacientes aqui estudados com LTA na forma esporotricóide apresentaram porcentagens de positividade relevantes nos exames utilizados para o diagnóstico específico de leishmaniose, a saber: 58,8% apresentaram sorologia positiva pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), embora os títulos não fossem muito elevados, em concordância com os dados de literatura sobre a leishmaniose cutânea (Anthony, Christensen & Johnson, 1980; Guimarães et al, 1983); 78,9% apresentaram positividade pelo ELISA; 87,0% apresentaram cultura para promastigotas do gênero *Leishmania* positiva em meio NNN; 22 pacientes apresentaram processo inflamatório crônico granulomatoso (43,4%) e/ou visualização de amastigotas (47,8%) ao exame histopatológico, e apenas um paciente apresentou processo inflamatório crônico inespecífico, com plasmocitose tecidual. Destacamos ainda que todos os pacientes apresentaram-se como fortes reatores à IDRM (leituras iguais ou superiores a 10 mm), apesar de não ter sido observada significância estatística na comparação com os pacientes LC. Devido a este fato, poderíamos sugerir que, quando houvesse dúvida diagnóstica entre LTA e esporotricose as leituras de IDRM acima de 9 mm poderiam reforçar a hipótese de que um caso com apresentação clínica de úlcera com linfangite nodular centrípeta seja de leishmaniose tegumentar americana, já que em analogia com as leituras do PPD (Ministério da Saúde: Tuberculose, 2002), podem ser considerados fortes reatores os indivíduos com leituras de induração superiores a 9 mm (Marzochi et al, 1980).

A reação positiva para IDRM em casos de LTA esporotricóide torna-se ainda mais relevante quando observamos que a maior parte dos recursos diagnósticos não está disponível em muitas das unidades de saúde, onde o diagnóstico é feito com base nas informações epidemiológicas, aparência clínica das lesões e IDRM, quando disponível. Entretanto, em pacientes com esporotricose no Rio de Janeiro, leituras de IDRM acima de 9 mm foram encontradas, variando de 12% dos pacientes, quando fenol foi empregado como diluente, a 39%, quando timerosal foi empregado como diluente (de Lima Barros, 2005). A substituição do timerosal por fenol como diluente do reagente empregado na realização de IDRM foi advogada, de modo a evitar resultados

falsos positivos devido à hipersensibilidade ao timerosal (Fagundes, 2007). Assim, o encontro de IDRMs positivos em casos confirmados de esporotricose, alguns deles classificados como fortes reatores, é um complicador adicional ao diagnóstico e ao acompanhamento dos pacientes quando as dúvidas quanto à etiologia da lesão permanecem, mesmo após a realização de todos os testes diagnósticos disponíveis.

Quanto aos outros resultados de exames laboratoriais, observamos que os pacientes com apresentação esporotricóide comportaram-se de maneira semelhante aos pacientes com formas cutâneas típicas de LTA, além de não apresentarem diferenças do ponto de vista de resposta ao tratamento ou prognóstico. Ambos os grupos demonstraram um alto índice de positividade nos testes realizados para o diagnóstico como mostrado anteriormente.

Na segunda fase deste estudo foi analisado o infiltrado inflamatório em 15 lesões cutâneas de pacientes com LTA esporotricóide, comparando os seus resultados com 30 lesões de pacientes com LTA na forma típica. Neste sentido, a composição e a organização da reação inflamatória local podem ser determinantes, tanto para o controle da infecção quanto para destruição tecidual com conseqüente agravamento das lesões (Rodrigues et al, 2010; Marreti-Mitra et al, 2011). Nosso estudo revelou um infiltrado inflamatório de moderado a intenso principalmente nas lesões de LTA esporotricóide com presença de importante expressão de NOS2 e neutrófilos, expressando elastase neutrofílica. Além disso, também foi identificada a formação de NETs.

Um fator indicativo de atividade das lesões esporotricóides foi o encontro consistente de neutrófilos nesta forma de apresentação. A liquefação do tecido ou “pus” é causada pela ativação e liberação de proteases. A lesão tecidual é, geralmente, vista como prejudicial, porém a destruição tecidual mediada por neutrófilos é um processo que traz benefício, pois proporciona a desestabilização das fibras de colágeno que facilita o contato das células inflamatórias com os microrganismos, e exerce pressão nos tecidos vizinhos (Nathan, 2006). Este mesmo autor discutiu a função de neutrófilos e sugeriu que estas células seriam componentes-chave da resposta inflamatória e contribuiriam para o recrutamento, ativação e programação de células apresentadoras de antígenos (APC). Através de contato célula-célula e produtos secretados, neutrófilos recrutariam e ativariam monócitos e células

dendríticas, através da produção de TNF- α . Neste estudo, encontramos uma intensa positividade de elastase neutrofílica aliada às lesões mais exuberantes de LTA esporotricóide, sugerindo a confirmação desta hipótese, permitindo a correlação direta da elastase neutrofílica com a atividade leishmanicida local. Trabalhos anteriores têm demonstrado a importância de neutrófilos no início da infecção por *Leishmania* spp demonstrando que camundongos depletados de polimorfonucleares neutrófilos apresentavam maiores cargas parasitárias (Lima et al, 1998). Por outro lado, a literatura tem pontuado a importância da associação de patógenos na apresentação clínica e evolução de lesões tegumentares pela associação de infecções secundárias por bactérias e fungos intensificando a injúria da pele (Taskapan et al, 2000). Desta forma, mesmo se os neutrófilos estivessem presentes nas lesões devido a outros patógenos, sua atividade poderia contribuir para a intensidade do processo inflamatório e manutenção das lesões em atividade.

Foi identificado neste estudo, além da alta concentração de neutrófilos, uma formação de NETs mais intensa nas lesões de LTA esporotricóide. Foi visto que a formação de NETs e a degranulação de neutrófilos é diretamente relacionada à função de NADPH e intermediários reativos de oxigênio (ROIs), Elas surgem por um mecanismo específico de morte celular com formação de rede de material nuclear e enzimas que aprisionam e destroem microrganismos, inclusive leishmanias (Guimarães-Costa et al, 2009).

No presente estudo, observamos também uma intensa expressão de NOS2 em lesões esporotricóides, significativamente maior do que nas lesões típicas, o que sugere, indiretamente, uma ação microbicida dos macrófagos nestas lesões. A ausência de correlação entre NOS2 e macrófagos sugere que muitas destas células poderiam não estar ativadas ao seu estado parasiticida. Muitos macrófagos parasitados não são bem-sucedidos em destruir os parasitas devido a mecanismos de escape como a degradação de moléculas MHC-II, prejudicando assim a apresentação de antígenos e ativação de células T helper (Lang et al., 1994). Em adição, já foi verificado que macrófagos contendo neutrófilos apoptóticos fagocitados não são capazes de entrar em estado de ativação, permitindo assim a multiplicação dos parasitas. Este fenômeno foi denominado de “cavalo de tróia” e tem sido implicado na evasão e manutenção dos parasitas nas lesões ((Laskay, van Zandbergen & Solbach,

2008; Ritter, Frischknecht, Van Zandbergen, 2009). Assim, neutrófilos poderiam influenciar a carga parasitária tanto para sua diminuição (ativação, degranulação e formação das NETs) quanto para seu aumento (diminuição da atividade de macrófagos). Nossos dados não permitem comprovar a existência de inibição de macrófagos por neutrófilos, mas a ausência de correlação entre o número total de macrófagos e áreas positivas para NOS2 sugerem função alterada destas células. Mesmo assim, o aumento significativo de neutrófilos e NOS2 nas lesões da forma esporotricóide de LTA indicam maior atividade inflamatória tóxica *in situ* o que também poderia explicar a maior destruição tecidual. Apesar disto, estes macrófagos são ainda capazes de liberar citocinas e quimiocinas que atraem mais macrófagos para o sítio de lesão. A expressão de NOS2 nas lesões ativas de LTA já foi verificada (Morgado et al, 2008) assim como a função de NO no controle da carga parasitária (Stenger et al, 1996), sendo importante na defesa do hospedeiro, podendo também atuar como agente citotóxico nos processos patológicos (Aktan et al, 2004). Em conjunto os dados sugerem que as lesões esporotricóides apresentariam um menor controle do processo inflamatório gerando uma resposta mais intensa, com maior produção de NO e destruição tecidual, causando lesões mais extensas quando comparadas com as formas típicas da LTA.

Apesar de não ter sido encontrada correlação estatística entre a alta expressão de NOS2 e baixa quantidade de parasitas, esta associação tem sido descrita na literatura como uma importante função de NOS2 na eliminação das formas amastigotas do sítio de lesão (Morgado et al, 2008; Palmeiro et al, 2012). Assim, sugerimos que o controle da carga parasitária nas lesões de LTA esporotricóide deva ocorrer também por outros mecanismos como a ativação de neutrófilos.

Machado et al (2002) estudando a citotoxicidade *in situ* na LTA, observaram uma notável presença de células TCD8⁺ e células ativadas, e sugeriram que este tipo celular estaria envolvido na eliminação do parasita e desenvolvimento da úlcera. Além disso, Da-Cruz et al. (1994) sugeriram que o aumento dos níveis de células TCD8⁺ e a produção de IFN- γ poderiam ser importantes para a cura das lesões e também para proteção imunológica. No nosso estudo, as células TCD8⁺ apresentaram tendência a maiores quantidades nas lesões esporotricóides, apesar de não haver significância

estatística. Este achado poderia estar relacionado à necessidade de maior atividade citotóxica local como forma de controle da carga parasitária.

As células de Langerhans CD1a⁺ foram observadas distribuídas na epiderme formando uma rede de células, sendo que algumas destas foram visualizadas próximas a vasos, sugerindo uma movimentação em relação a epiderme. Um aumento significativo de CD1a⁺ foi encontrado nas lesões esporotricóides, sugerindo uma elevação na atividade de captura e transporte de antígenos protéicos para os linfonodos (Moll et al., 1995). É sabido que a apresentação de antígenos é etapa fundamental para o estímulo de resposta imune, mas sua manutenção pode levar a estágios crônicos de inflamação, muitas vezes prejudiciais para a cura das lesões.

Outra alteração com significância estatística foi uma diminuição da expressão de Bcl-2 em lesões de LTA esporotricóide quando comparadas com lesões de LTA na forma típica. A presença de Bcl2 está ligada a preservação das células em atividade por diminuição do apoptose. A diminuição da expressão de Bcl-2 poderia aumentar o processo inflamatório pela maior destruição celular e conseqüente liberação de conteúdo tóxico celular. Desta forma o desequilíbrio na resposta inflamatória poderia estar acontecendo por vários fatores que em conjunto levariam a maior gravidade das lesões.

Os outros marcadores estudados não apresentaram alterações estatisticamente significativas entre as duas formas clínicas.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que as lesões com apresentação esporotricóide da LTA têm caráter mais inflamatório e destrutivo, identificado tanto por parâmetros clínicos quanto de resposta imune. A intensidade do processo inflamatório mais difuso, associada à intensa necrose com formação de pus, seria o reflexo do desequilíbrio da resposta imune. Os mecanismos envolvidos na evolução da LTA para formas típicas ou atípicas, o controle do processo inflamatório e o estabelecimento do equilíbrio parasito-hospedeiro ainda precisam ser melhor compreendidos. Sabe-se que a evolução da leishmaniose cutânea depende do balanço de resposta TH1/TH2, onde uma resposta do tipo 1 predominante levaria à resistência e cura, enquanto uma resposta predominantemente do tipo 2 levaria à suscetibilidade e doença progressiva (Uzonna e Bretscher, 2001). No entanto, tanto o desequilíbrio para mais quanto para menos poderia trazer como conseqüência

maior gravidade das lesões. Ainda, os resultados aqui apresentados, assim como outros já publicados (Morgado et al, 2008, Morgado et al, 2010, Rodrigues et al, 2010; Marreti-Mitra et al, 2011, Palmeiro et al, 2012) sugerem um controle multifatorial, o que dificulta a compreensão da evolução das lesões de LTA para a cura ou cronicidade/agravamento.

A evidência de diferenças entre as formas esporotricóide e típica de LTA sugere que a formação das lesões não depende somente do agente infeccioso e que outros mecanismos podem estar envolvidos na formação dessa apresentação clínica. Um estudo comparando a forma esporotricóide da LTA e a forma cutâneo-linfática da esporotricose está em andamento, para melhor caracterização das semelhanças e diferenças entre estas duas doenças. Até o momento pode-se afirmar que as duas apresentam diversas características similares tanto clínicas quanto imunológicas. Estudos estão sendo realizados para avaliar outros marcadores, notadamente relacionados à imunorregulação de modo a esclarecer melhor o papel da qualidade de resposta imune na evolução da LTA.

Levando-se em consideração o aspecto clínico das lesões, o número de lesões, informações epidemiológicas e a IDRM, será possível garantir um bom índice de acertos no diagnóstico. Porém, sempre que possível, o profissional deverá recorrer a outros recursos diagnósticos, como exames micológico e histopatológico, *imprint* e cultura para *Leishmania* spp, exames sorológicos para *Leishmania* spp. Quando isto não for possível, pode-se realizar teste terapêutico. Porém, nos casos com má resposta terapêutica, há necessidade de se encaminhar os pacientes para investigação em centros com maiores recursos laboratoriais.

7. CONCLUSÕES

1- Na forma esporotricóide da LTA as lesões eram mais freqüentes nos membros superiores, e em mulheres com idade superior àquela observada nos casos de lesão típica de LTA;

2- A forma esporotricóide da LTA, embora mais grave, não diferia quanto ao tempo de evolução nem quanto à resposta terapêutica;

3- Corroborando esta hipótese os resultados de exames diagnósticos foram semelhantes nos dois grupos, apesar da tendência a maior intensidade da resposta ao teste intradérmico de Montenegro nos pacientes de LTA Esporotricóide;

4- Também foram observadas diferenças significativas na composição e organização da reação inflamatória *in situ*, principalmente pela maior concentração de áreas positivas para NOS2, elastase neutrofílica (neutrófilos) e NET. Os resultados indicam uma intensa atividade enzimática que tanto pode levar ao controle da carga parasitária quanto à destruição de tecidos. A destruição dos tecidos poderia explicar a disseminação local do parasita verificada pela presença de lesões múltiplas ao longo do trajeto de vasos linfáticos;

5- Apesar disto, as proporções de linfócitos T e B foi considerada semelhante, sugerindo que outros parâmetros como mediadores inflamatórios possam estar atuando na lesão;

6- A diminuição da expressão de Bcl2, mesmo na ausência de mudança significativa na expressão de Fas/FasL, pode ser um destes fatores que alteram a atividade inflamatória pois sugere uma maior atividade de morte celular com possíveis conseqüências para os tecidos adjacentes, facilitando a formação e disseminação local da lesão.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. Editora Revinter, 6ª edição, 2008.
- Amato VS, de Andrade HF, Duarte MI. Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop*. 2003; 85:39 – 49.
- Amprey, J L. et al. Inhibition of CD1 Expression in Human Dendritic Cells during Intracellular Infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun*. 2004 January; 72(1): 589–592.
- Anthony RL, Christensen HA, Johnson CM. Micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1980; 29:190-4.
- Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*. 2004 Jun; 25;75(6):639-653.
- Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007; 101:735 –7.
- Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, et al.. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: Evaluation by two molecular markers. *Experimental Parasitology*. 2009; 42:317-322.
- Bari A, Rahman S. Correlation of clinical, histopathological, and microbiological findings in 60 cases of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2006; 72: 28-32.
- Bari AU, Rahman SB. Many faces of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2008; 74:23-7.
- Barral A, Barral-Netto M, Almeida R, Ribeiro de Jesus A, Grimaldi GJr, Netto EM, et al. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *Am. J Trop Med Hyg*. 1992; 47:587-92.
- Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1995; 53:256-9.
- Barral-Netto M, Barral A, Broodskyn C, Carvalho EM, Reed SG. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1995, Jan;17(1):21-8.

Barros M.B.L., Schubach T.M.P., Galhardo M.C.G., Schubach A.O., Monteiro P.C., Reis, R.S., et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38:529-35.

Barros MBL, Paes RA, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011; 24:633-654.

Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(6):401-9.

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

Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med.* 2001; 191(12): 2121-2129.

Brinkmann V, Zychlinsky, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Aug; 5(8):577-82.

Chapman SW, Daniel CR. Cutaneous manifestations of fungal infection. *Infect Dis Clin North Am.* 1994; 8:879 – 910.

Conceição-Silva F, Hahne M, Schröter M, Louis J, Tschopp J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 1998 Jan;28(1):237-45.

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

Costa JML, Saldanha ACR, Silva ACM, Serra-Neto A, Galvão CES, Silva CMP, et al. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão. II. Aspectos epidemiológicos e clínico-evolutivos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 1992; 25:115-123,.

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

Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. *Leishmania*-Reactive

CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 1994; 62(6): 2614-2618.

De Lima Barros MB, Schubach A, Francesconi-do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TM, Conceição-Silva F, et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Acta Trop.* 2005; 93: 41-7.

De Lima Barros MB, Schubach TM, Galhardo MC, de Oliveira Schubach A, Monteiro PC, Reis RS, et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96: 777-9.

De Magalhães AV, Chiarini LH, Raick AN. The histopathology of cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop.* 1982;24(5)268-76.

De Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, CubaCC, et al. Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania brasiliensis brasiliensis*. *Rev Inst Med Trop.* 1986;28(4)253-62.

Derossi, D. Avaliação da expressão da proteína bcl-2 no carcinoma de mama: estudo em punção aspirativa por agulha fina; correlação com grau histológico em espécimes cirúrgicos correspondentes. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2003 July/Sept;39(3).

Ejaz A, Raza N, Iftikhar N. Recurrent cutaneous leishmaniasis presenting as sporotrichoid abscesses: A rare presentation near Afghanistan border. *Dermatology Online Journal.* 2007; 13:15.

Facchetti F, Vermi W, Fiorentini S, Chilosi M, Caruso A, Duse M, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human granulomas and histiocytic reactions. *Am J Pathol.* 1999;154(1):145-52.

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

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2005; 37(11):719-27.

Farah FS, Klaus SN, Frankenburg S, et al. Protozoan and helminth infections. In: *Dermatology in General Medicine*, Vol II, 4th Ed. New York: McGraw-Hill; 1993; 2772-2777.

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

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

Gontijo B. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2003 jan-fev;36(1):71-80.

- Grevelink SA, Lerner E. Leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1996;34: 257-272,.
- Guerra JAO, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003; 36: 587-590.
- Guimarães MC, Celeste BJ, Camargo ME, Diniz JM. Seroepidemiology of cutaneous leishmaniasis from Ribeira do Iguape Valley. IgM and IgG antibodies detected by means of an immunoenzymatic assay (ELISA). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1983; 25: 108 – 12.
- Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2009 Abr 21; 106(16):6748-6753.
- Iftikhar N, Bari I, Ejaz A. Rare variants of cutaneous leishmaniasis: whitlow, paronychia and sporotrichoid. *International Journal of Dermatology*. 2003; 42: 807-809.
- José FF, Silva IM, Araújo MI, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2001; 34 (6): 537-542.
- Kauffman CA. Sporotrichosis. *Clin Infect Dis* 1999; 29:231-236.
- Korsmayer S. Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surveys*, 15: 105-118, 1992.
- Lang RA, Lustig M, Francois F, Sellinger M, Plesken H. Apoptosis during macrophage-dependent tissue remodelling. *Development*, 1994; 120: 3395-3403.
- Laskay T, van Zandbergen, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cell and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection promoting factor. *Immunobiol.* 2008. 213: 183-191.
- Lima GMAC, Vallochi AL, Silva UR, Bevilacqua EMAF, Kiffer MMF, Abrahamsohn IA. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.* 1998; 64: 145-151.
- Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol.* 2002; 12(5):449-51.
- Manzur A, Bari A. Sensitivity of leishmanin skin test in patients of acute cutaneous leishmaniasis. *Dermatology Online Journal*. 2006; 12 (4): 2.
- Marreti-Mitra AC, De Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, De Oliveira MP, Craft N, Pirmez C. Therapeutic failure in american cutaneous leishmaniasis is

associated with gelatinase activity and cytokine expression. Clin Exp Immunol. 2010 Nov; 22.

Marzochi MC, Coutinho SG, Sabroza PC, de Souza WJ. Reação de Imunofluorescência indireta e intradermo-reação para leishmaniose tegumentar americana em residentes da região de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo de resultados observados em 1974 e 1978. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1980; 22: 149 – 55.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (Espundia Escomei, 1911). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1986; 80: 859-87.

Marsden, PD, Nonata, RR. Mucocutaneous leishmaniasis. A review of clinical aspects. Rev Soc Bras Med Trop. 1975; 9: 309-326.

Masmoudi A, Ayadi N, Khabir A, Bouzid L, Bouassida S, Meziou TJ, et al. Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis in Tunisia: a clinical and histological study. Ann Dermatol Venereol. 2008; 135: 63-7.

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

Mendonça SC, Coutinho SG, Amendoeira RR, Marzochi MC, Pirmez C. Human American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. Clin Exp Immunol. 1986; 64: 269 – 76.

Meneses CR, de Azevedo AC, da Costa SM, Costa WA, Rangel EF. Ecology of American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. J Vector Ecol. 2002; 27: 207 – 14.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 2002, 100 p.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. atualizada. Brasília, 2010, 180-182 p.

Moll H, Flohé S, Rölinghoff M. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. Eur J Immunol. 1995; 25: 693-699.

Morgado FN, Schubach, AO, Rosalino CMV, Quintella, LP, Santos, GPL dos, Salgueiro, MM, 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. 2008; 158:50-58.

Morgado, FN, Schubach A, Vasconcellos E, Azeredo-Coutinho RB, Valet-Rosalino CM, Quintella LP, et al. Signs Of An Inflammatory Reaction In Scars Of Human American Tegumentary Leishmaniasis. Parasite Immunology (Print).

2010;32: 285-295.

Morgado FN, Schubach AO, Barros MB, Conceição-Silva. The In Situ Inflammatory Profile Of Lymphocutaneous And Fixed Forms Of Human Sporotrichosis. *Medical Mycology*. 2011; 1-9.

Moura TR, Oliveira, F, Rodrigues, GC, Carneiro MW, Fukutani KF, Novais FO, et al. Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis* *Plos Neg. Trop Dis*. 2010. 4:7-12.

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

Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM et al. Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance against *Leishmania braziliensis* Infection. *The Journal of Immunology*. 2009December 15;183(12): 8088-8098

Oishn M, Maeda K, Suguyama S. Distribution of apoptosis-mediating Fas antigen in human skin and effects of anti-fas monoclonal antibody on human epidermal keratinocyte and squamous carcinima cell. *Arch Dermatol Res*. 1996; 286: 396.

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

Park SH, Bendelac A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. *Nature*. 2000; 406 (6797): 788–92.

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

Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol*. 2004; 15(9):1319-29.

Pineda JA, Macías J, Morillas F, Fernández-Ochoa J, Cara J, de la Rosa R, et al. False-positive results of leishmanin skin test due to phenol-containing diluents. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001; 95 (2): 173-4.

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

Quintella L, Cuzzi T, Madeira M, Okamoto T, Schubach Ao. Immunoperoxidase Technique Using An Anti-*Leishmania (L.) Chagasi* Hyperimmune Serum In The Diagnosis Of Culture-Confirmed American Tegumentary Leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop*. 2009;51(2):83-86.

Ritter U, Frischknecht F, Van Zandbergen G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends in Parasitol*. 2009; 25: 505-510.

Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65:456 – 65.

Rodrigues KM, Oliveira MP, Maretti-Mitra AC, Oliveira-Neto M, Mattos MS, Silva L, et al. Influence of the Notch system in the therapeutic response of American tegumentary leishmaniasis. *Br. J. Dermatol.* 2011; 164:1228- 1234.

Rodríguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Tariff, H., Bloom, B.R., Convit, J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology.* 1994; 32(9): 2246-2252.

Sadeghian G, Momeni A, Siadat AH, Usefi P. Evaluation of leishmanin skin test and its relationship with the clinical form and duration of cutaneous leishmaniasis. *Dermatology Online Journal.* 2006; 12 (7): 3.

Schneider, P; Bodmer J L, Holler N, Mattmann C, Scuderi P, Terskikh A, et al . Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction. *J. Biol. Chem.* 1997; 272 (30): 18827–18833.

Schonk DM, Kuijpers HJ, van Drunen E, van Dalen CH, Geurts van Kessel AH, Verheijen R, et al. Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum. Genet.* 1989; 83 (3): 297–9.

Serarslan, G. Atik, E. Expression of inducible nitric oxide synthase in human cutaneous leishmaniasis. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2005; 280: 147–149.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. 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.

Silveira FT, Lainson R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CEP. Reviewing the role of dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(11):1075-80.

Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring simpatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97: 759 – 65.

Starling, G C; Bajorath J, Emswiler J, Ledbetter J A, Aruffo A, Kiener P A.. Identification of amino acid residues important for ligand binding to Fas. *J. Exp. Med. (UNITED STATES)* 1997; 185 (8): 1487–1492.

Stenger S, Donhauser N, Thüning H, Röllinghoff M, Bogdan C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 1996 Apr 1;183(4):1501-1514.

Taskapan MO, Kumar P. Role of staphylococcal superantigens in atopic dermatitis: from colonization to inflammation. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000; 84:3–10.

Tobin EH, Jih WW. Sporotrichoid lymphocutaneous infections: etiology, diagnosis and therapy. *Am Fam Physician*. 2001; 63: 326-32.

Uzzona JE, Bretscher PA. Anti-IL-4 antibody therapy causes regression of chronic lesions caused by medium-dose *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Eur J Immunol*. 2001; 31: 3175-3184.

Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJ, Oliveira MP, Rutowitsch MS, et al.- Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro). *Int J Dermatol*. 2008;47(9):926-32.

9. ANEXOS

Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido¹

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – FIOCRUZ

COORDENADOR DA PESQUISA: ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH

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

¹ 1ª via: Prontuário Médico

2ª via: Paciente

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 "língua", de pele ou de mucosa (lesadas ou aparentemente sadias) para realização de exames tanto para diagnóstico (aspecto microscópico do tecido e culturas para tentativa de isolamento de possíveis agentes de doença como fungos, bactérias e leishmanias) quanto para pesquisa (identificação de células e outros componentes da resposta inflamatória, assim como novos métodos de identificação dos possíveis agentes da doença). Outros materiais também poderão ser coletados na tentativa de isolamento do agente causador da doença: aspiração com seringa e agulha do bordo da lesão e de secreções em lesões de pele fechadas.

Outros exames também serão realizados para diagnosticar outras doenças possíveis de serem confundidas com a LTA, para classificar a gravidade da doença e avaliar os efeitos dos medicamentos a serem utilizados durante o seu tratamento: um a quatro testes cutâneos (injeção da décima parte de um mililitro de um reativo para determinada doença na pele da região anterior do antebraço, a qual deverá ser revista entre 2 a 3 dias após a injeção); exames de sangue (quantidade equivalente a aproximadamente três

colheres de sopa), exame de saliva (coletada com um tipo de cotonete), radiografia dos pulmões e da face (se necessário complementada por tomografia computadorizada); eletrocardiograma; e audiometria e otoscopia.

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

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

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

Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais:

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

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

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

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

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

Formas de ressarcimento:

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

Benefícios esperados:

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

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

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

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

_____ Nome paciente:	_____ Data
_____ Nome médico:	_____ Data
_____ Nome testemunha ² :	_____ Data
_____ Nome testemunha ² :	_____ Data

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

Anexo II - Termo de Compromisso e Responsabilidade

TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, **FÁTIMA CONCEIÇÃO-SILVA**, coordenadora e **LIVIA MARTINS VELOSO DE CARVALHO**, aluna do projeto de pesquisa intitulado “**COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E DE IMUNIDADE CELULAR ENTRE A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA COM APRESENTAÇÃO CLÍNICA ESPOROTRÍCÓIDE E A FORMA DE APRESENTAÇÃO TÍPICA DA DOENÇA**”, 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.

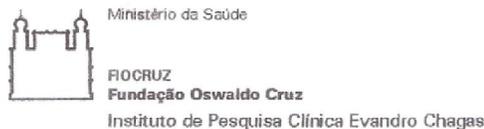
Os resultados obtidos com esta pesquisa serão divulgados em comunicações científicas mantendo o anonimato dos participantes e o material utilizado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando abertos novos protocolos.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____.

Fátima Conceição Silva

Lívia Martins Veloso de Carvalho

Anexo III - Parecer de aprovação no CEP



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 066/2010

Protocolo 0056.0.009.000-10

1. Identificação:

Título do Projeto: “Comparação de parâmetros clínicos, laboratoriais e de imunidade celular entre a leishmaniose tegumentar americana com apresentação clínica esporotricóide e a forma de apresentação típica da doença”.

Pesquisadora Responsável: Fátima Conceição Silva (IOC).

Mestranda: Lívia Martins Veloso de Carvalho.

Instituição Responsável: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ.

Data de Apresentação ao CEP: 15/10/2010.

2. Sumário:

Visa a avaliar a resposta imune celular *in situ* dos pacientes apresentando forma esporotricóide da LTA, correlacionando este achado com parâmetros clínicos e laboratoriais com vistas à diferenciação com a lesão típica LTA. Tem como objetivos específicos: a) Comparar os resultados dos exames laboratoriais por ocasião do diagnóstico (IDRM, sorologia para leishmaniose – reação de imunofluorescência indireta e/ou ELISA para *Leishmania*, cultura e “*imprint*” para *Leishmania*, exame histopatológico), nos pacientes portadores de leishmaniose com apresentação esporotricóide em relação aos casos de apresentação típica; b) Caracterizar a resposta imune celular *in situ* por imunohistoquímica nas lesões ativas de LTA com forma esporotricóide; c) Comparar os resultados *in situ* obtidos nas lesões esporotricóides com aqueles obtidos nas lesões típicas de LTA; d) Correlacionar os achados *in situ* com os dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Trata-se de um estudo seccional com controle pareado de critérios prognósticos para leishmaniose esporotricóide. Foi feita inicialmente uma seleção de pacientes com LTA esporotricóide através de coleta de dados nos prontuários atendidos no Laboratório de Vigilância em Leishmaniose, Ipec/Fiocruz. No período compreendido entre janeiro de 2004 e setembro de 2009 foram identificados 13 casos com estas características. Sequencialmente será feita a seleção do grupo controle por pareamento com pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana diagnosticados no Lab. Vigileish no mesmo período, com formas clínicas típicas da enfermidade. O número de pacientes com formas típicas estudado deverá ser pelo menos o dobro do número de pacientes com a forma esporotricóide. Os parâmetros para pareamento deverão incluir sexo e idade. Se houver novos pacientes com forma “esporotricóides” de LTA até dezembro de 2010 no Lab. Vigileish, estes poderão ser incluídos no estudo, com

“Comparação de parâmetros clínicos, laboratoriais e de imunidade celular entre a leishmaniose tegumentar americana com apresentação clínica esporotricóide e a forma de apresentação típica da doença”.

um correspondente aumento do número de pacientes com formas “típicas” de LTA cutânea, caso os dados obtidos se mostrem inconclusivos. Este estudo é um subprojeto do projeto principal “Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com leishmaniose tegumentar americana no Centro de Referência em LTA - IPEC/Fiocruz”, CAAE 0016.0.009.000-02, aprovado pelo CEP/IPEC em 04/11/2002, coordenado pelo Dr. Armando de Oliveira Schubach.

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. Foi elaborado um Termo de Compromisso, onde o pesquisador responsável compromete-se a não revelar a identidade dos pacientes do projeto em qualquer publicação resultante deste estudo, protegendo sua confidencialidade. As fontes de recursos serão PAPES 5 (Fátima da Conceição Silva) e CNPq (Armando de Oliveira Schubach), sem impacto no POM da unidade.

4. Diligências:

Não houve.

5. Parecer: APROVADO.

Data da Reunião: 13 de dezembro de 2010.

Assinatura do Coordenador:



Dr.ª Léa Camillo-Courc
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ