



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

KALYNE MONYQUE LOPES DE BRITO

**ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DOS MARCADORES CD68, CD123⁺ E TCD4
EM LESÕES DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

RECIFE

2021

KALYNE MONYQUE LOPES DE BRITO

**ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DOS MARCADORES CD68,CD123⁺ E TCD4
EM LESÕES DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Morfotecnologia do Centro de
Biociências da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para obtenção do
título de Mestre.

Área de concentração: Morfologia e Inovações
Tecnológicas

Orientador (a): Prof^a Dr^aFrancisca Janaína Soares Rocha

Coorientador (a): Prof^a Dr^aJuliana Pinto De Medeiros

RECIFE
2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Brito, Kalyne Monyque Lopes de

Análise imunohistoquímica dos marcadores CD68,CD123⁺ e TCD4⁺ em lesões de pacientes com Leishmaniose / kalyne Monyque Lopes de Brito. – 2021.

68 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Janaína Soares Rocha .

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Pinto de Medeiros.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Recife, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. Leishmaniose. 2. Histoquímica. 3. Histopatologia. I. Rocha, Francisca Janaína Soares (orientador). II. Medeiros, Juliana Pinto de (coorientador) III. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-123

KALYNE MONYQUE LOPES DE BRITO

**ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DOS MARCADORES CD68, CD123⁺ E TCD4
EM LESÕES DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Morfotecnologia do Centro de
Biociências da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para obtenção do
título de Mestre.

Área de concentração: Morfologia e Inovações
Tecnológicas

Aprovado em: 20/12/2021

BANCA EXAMINADORA DE MESTRADO

Prof^a Dr^a Francisca Janaína Soares Rocha
Presidente da Banca

Dr. Gilberto Nicacio Batista
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr^a. Verônica Santos Barbosa
Sanitarista da Prefeitura do Recife

Dr. Wheverton Ricardo Correia Do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me presentear e iluminar durante toda a caminhada. Agradeço também por todas as surpresas, desafios e presentes ao qual me foi concebido no decorrer deste percurso.

Aos meus pais, Sandra e José Luiz, por sempre acreditarem em mim, por me impulsionar a seguir em frente, pelos incentivos, confiança, pela parceria, por sonhar junto comigo e vibrar por cada etapa concluída. A minha avó, Carmelita, que é meu exemplo e inspiração, grata por cada ensinamento compartilhado e por tornar a caminhada mais leve. A minha irmã Katherine, que sempre embarcou comigo, sendo meu braço direito, erguendo-me do chão quando preciso. Grata por tamanho carinho, pelas palavras de incentivo, por acreditar e sonhar junto comigo. O que sou hoje, é reflexo do que cada um de vocês representa em minha vida.

As minhas orientadoras, Dr^a Francisca Janaína Soares Rocha e Dr^a Juliana Pinto de Medeiros, pelo exemplo de mulheres pesquisadoras e humanas. Vocês foram peças essenciais para que este sonho pudesse se tornar realidade. Grata pela acolhida, parceria, compreensão, pelos ensinamentos compartilhados, pelos incentivos, por me fazer acreditar que posso ir além das minhas expectativas, pela dedicação, generosidade e amizade. Sou imensamente grata a vocês, isso não seria possível se não estivessem ao meu lado. Vocês foram verdadeiros anjos. Gratidão!

A realização deste trabalho é fruto de um esforço coletivo cujo resultado pode ser visto como o produto da dedicação de todos envolvidos, desde sua concepção até a conclusão. A todos que de alguma forma contribuíram de forma direta ou indireta, meu mais sincero agradecimento.

A todos os colegas do Laboratório De Parasitologia (Equipe *Leishmania*), da Clínica Dermatológica da UFPE, da FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Aggeu Magalhães sem os quais não seria impossível realizar esta dissertação.

Agradeço finalmente à Universidade Federal de Pernambuco por mais uma chance de aprendizado em suas dependências e com seus professores e alunos.

A ESTRADA

Você não sabe o quanto eu caminhei
pra chegar até aqui.
Percorri milhas e milhas antes de dormir
Eu nem cochilei.
Os mais belos montes escalei.
Nas noites escuras de frio chorei, ei, ei...
A vida ensina e o tempo traz o tom pra nascer
uma canção.
Com a fé do dia-a-dia encontro a solução,
encontro a solução...
Meu caminho só meu pai pode mudar
Meu caminho só meu pai
Meu caminho só meu pai...

(Toni Garrido / Lazão / Da Gama / Bino - 1998)

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma antroponose crônica que acomete cartilagens, mucosas e pele. As alterações histopatológicas consistem em um infiltrado de células inflamatórias com reações granulomatosas com ou sem necrose. O trabalho objetivou avaliar as células envolvidas no infiltrado inflamatório - macrófagos, linfócitos T e células dendríticas nas lesões de Leishmaniose Tegumentar Humana. O estudo foi realizado no período de janeiro de 2016 a dezembro de 2019 em pacientes atendidos no serviço de Dermatologia. As biópsias recolhidas foram submetidas a PCR para detecção da *Leishmania braziliensis*. As amostras positivadas seguiram para o ensaio imunohistoquímico (IMQH), para identificação das células envolvidas no infiltrado inflamatório, utilizando os anticorpos CD68, TCD4+ e CD123+. Dos 108 pacientes examinados, 34 deles positivaram para *Leishmania braziliensis* e em um foi possível identificar a amastigota, forma infectante; dos quais 21 pacientes (correspondendo às 22 amostras de tegumento que seguiram para a IMQH). Das 22 amostras, 15/22 corresponderam a dermatite granulomatosa e 4/22 à fibrose dérmica cicatricial. Aproximadamente 91% dos casos de dermatite granulomatosa apresentaram granuloma, destes apenas 9% das úlceras crônicas ativas apresentaram granuloma. Quanto ao número de células, a mais frequente foram os macrófagos, com prevalência de 62%, seguido por 23% de células TCD4+ e 15% de células dendríticas. Ao analisar individualmente os tipos de células e o diagnóstico histopatológico, verificamos que os resultados demonstraram, por meio do Teste G – Independência, que não houve associação estatística significativa ($p>0,05$) entre a presença de macrófagos, de células dendríticas e de células T CD4+ e o diagnóstico histopatológico, provavelmente devido ao baixo número de pacientes, a falta de informação quanto ao tempo de evolução da lesão e as perdas das amostras parafinadas no estudo.

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar; biomarcadores; imunohistoquímica.

ABSTRACT

Cutaneous Leishmaniasis (TL) is a chronic anthroponosis that affects cartilage, mucous membranes and skin. Histopathological changes consist of an inflammatory cell infiltrate with granulomatous reactions with or without necrosis. The study aimed to evaluate the cells involved in the inflammatory infiltrate - macrophages, T lymphocytes and dendritic cells in Human Tegumentary Leishmaniasis lesions. The study was carried out from January 2016 to December 2019 in patients treated at the Dermatology service. The collected biopsies were submitted to PCR for detection of *Leishmania braziliensis*. The positive samples were submitted to the immunohistochemical assay (IMQH), to identify the cells involved in the inflammatory infiltrate using the CD68, TCD4+ and CD123+ antibodies. Of the 108 patients examined, 34 were positive for *Leishmania braziliensis* and one was able to identify the amastigote, the infective form; of which 21 patients, corresponding to 22 integument samples, went to the IMQH. Of the 22 samples, 15/22 corresponded to granulomatous dermatitis and 4/22 to scarring dermal fibrosis. Approximately 91% of cases of granulomatous dermatitis had granuloma, of which only 9% of chronic active ulcers had granuloma. Regarding the number of cells, the most frequent were macrophages, with a prevalence of 62%, followed by 23% of CD4+ T cells and 15% of dendritic cells. When individually analyzing the cell types and the histopathological diagnosis, we verified that the results demonstrated, through the G Test - Independence, that there was no statistically significant association ($p>0.05$) between the presence of macrophages, dendritic cells and CD4+ T cells and the histopathological diagnosis, probably due to the low number of patients, the lack of information regarding the time of evolution of the lesion and the loss of paraffin samples in the study.

Keywords: leishmaniasis tegumentary; biomarkers; immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

Figura 1 -	Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar por município de infecção. Brasil, 2000 a 2019. Sendo a região Norte mais afetada (Boletim epidemiológico de doenças negligenciadas, 2021).	17
Figura 2 -	Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar por município de infecção. Brasil, no intervalo de 2017 a 2019 (Sinan / MS ,2021).	18
Figura 3 -	Forma promastigota (A) e amastigota no interior de macrófagos (B) de <i>Leishmania</i> sp.	19
Figura 4 -	Flebotomíneo, vetor da leishmaniose, conhecido também como mosquito palha.	21
Figura 5 -	Ciclo evolutivo da <i>Leishmania</i> sp. nos hospedeiros vertebrados e invertebrados.	23
Figura 6 -	- Manifestação clínica das lesões cutâneas. A – Lesão cutânea localizada única, com bordas elevadas e arredondadas e fundo granulomatoso. B - Lesão cutânea múltipla, ulcerada, com bordas elevadas, infiltrada, fundo granuloso. C - Forma cutânea disseminada: Lesões primárias ulceradas, com bordas elevadas e fundo granulomatoso. C 1 – Mesmo paciente da figura C, verifica-se a presença de lesões múltiplas, com algumas ulcerações superficiais. D e E – Lesões cutânea difusa.	25
Figura 7 –	Fluxograma do desenho experimental e população do estudo para leishmaniose tegumentar	35

ARTIGO

Figura 1 -	Fluxograma do desenho experimental e população do estudo para leishmaniose tegumentar	43
Figura 2 -	Identificação molecular de <i>Leishmania braziliensis</i> em amostras clínicas de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar. Utilizando ITS1-PCR, visualizada por eletroforese em gel de agarose a 1%, corada com brometo de etídio.	46
Figura 3 -	Regiões biopsiadas dos pacientes positivos para leishmaniose tegumentar por <i>Leishmania braziliensis</i>	47

Figura 4 -	Frequência da expressão histopatológica de 22 lesões tegumentares por <i>Leishmania braziliensis</i>	48
Figura 5 -	Perfil histopatológico vs células envolvidas no infiltrado inflamatório da leishmaniose tegumentar	52
Figura 6 -	A. Dermatite granulomatosa com presença de parasita intracelular em paciente com Leishmaniose Tegumentar por <i>Leishmania braziliensis</i> . Destacando a presença de Linfócitos T (TCD4 ⁺). B. Fibrose dérmica cicatricial em paciente com Leishmaniose Tegumentar por <i>Leishmania braziliensis</i> . Destacando a presença de células dendríticas. C. Dermatite granulomatosa com presença de parasita intracelular em paciente com leishmaniose tegumentar por <i>Leishmania braziliensis</i> . Destacando a presença de macrófagos. C.1. Controle. C2 e C3 células com marcação IMQ por CD 68.	54

LISTA DE TABELAS

DISSERTAÇÃO

- Tabela 1** - Principais subgêneros causadores da leishmaniose tegumentar e sua distribuição no território nacional (Adaptado MOTA; MIRANDA, 2011) 22
- Tabela 2** - Anticorpos utilizados para ensaio imunohistoquímico em pacientes com diagnóstico de leishmaniose 39

ARTIGO

- Tabela 1** - Característica genotípica e faixa etária de pacientes com diagnóstico clínico sugestivo para leishmaniose tegumentar. 45
- Tabela 2** - Diagnóstico clínico, relatório anatomopatológico e análise qualitativa da IMQH dos pacientes com diagnóstico confirmado para leishmaniose tegumentar, causada por *Leishmania braziliensis* 49
- Tabela 3** - Diagnóstico histopatológico vs presença/ausência das células envolvidas no infiltrado inflamatório. 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BR	Brasil
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CS	Centro de Biociências
cPCR	PCR Convencional
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ICLT	Índice Composto de Leishmaniose Tegumentar
IMQH	Imuno-histoquímica
ITS1	Espaçador Interno Transcrito 1
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCM	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
OPAS	Organização Pan- Americana de Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PE	Pernambuco
pK	Proteinase K
qPCR	PCR em Tempo Real
SD – UFPE	Serviço de Dermatologia da Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	HISTÓRICO	15
2.2	ASPECTOS BIOLÓGICOS GERAIS	15
2.3	SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA	16
2.4	AGENTE ETIOLÓGICO E VETOR	18
2.5	CICLO BIOLÓGICO – VETOR E HOSPEDEIRO	21
2.6	RESPOSTA DO HOSPEDEIRO	23
2.6.1	CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES	23
2.6.2	ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS	26
2.6.3	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS	28
2.7	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	31
2.8	TRATAMENTO	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	GERAL	34
3.2	ESPECÍFICOS	34
4	MÉTODOS	35
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL E POPULAÇÃO DE ESTUDO	35
4.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	36
4.2.1	DIAGNÓSTICO CLÍNICO E ANATOMOPATOLÓGICO	36
4.2.2	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	37
4.2.2.1	Extração do dna dos fragmentos de biópsias parafinizadas	37
4.2.2.2	Amplificação de DNA de <i>L. Braziliensis</i> pela ITS1 –PCR	38
4.2.3	ENSAIO IMUNO HISTOQUÍMICO – IMQH	38
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4.4	ASPECTOS ÉTICOS	40
5	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DOS MARCADORES CD68, CD123+ E TCD4+ EM LESÕES DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	41
6	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA / UFPE	68

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são infecções parasitárias crônicas, não contagiosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* sp., transmitida a partir da picada de flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia*, naturalmente infectada (OYAMA et al.,2018; ALMEIDA; SANTOS, 2011). Integra o grupo de infecções negligenciadas, sendo uma das cinco de maior relevância para saúde pública no mundo tendo em vista sua ocorrência em países mais pobres, atingindo as populações mais vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde (OPAS/OMS, 2019). Tais infecções, podem resultar em amplo espectro de manifestações clínicas as quais são definidas a partir da interação existente entre a espécie do parasito, características do hospedeiro e a resposta imune do indivíduo infectado (ALMEIDA; SANTOS, 2011; FRAGA et al.,2012; VIANA et al., 2013).

Aproximadamente 90% dos casos na América são registrados no Brasil, Bolívia e Peru (BRASIL, 2019). Em 2018 no território nacional foram notificados 17.950 casos de LT, aproximadamente 94,42% expressaram a forma clínica cutânea. Em 2019, 15.484 novos casos foram confirmados no Brasil, com coeficiente de detecção de 7,37 casos a 100 mil habitantes. Os maiores percentuais de casos registrados foram na região Norte (Brasil, 2021). No mesmo ano no estado de Pernambuco foram confirmados 329 casos, sendo que 313 corresponderam à forma clínica cutânea e 16 à forma mucosa. Dos 29 casos confirmados em Recife, 23 corresponderam à forma cutânea e 6 à mucosa (BRASIL, 2021).

As alterações histopatológicas das lesões por LT consiste em um infiltrado inflamatório de células mononucleares, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e células plasmáticas á reações granulomatosas com ou sem necrose, podendo ser encontrada hiperplasia pseudoepiteliomatosa na epiderme (VIANA et al., 2012; VIANA et al., 2013). Embora o diagnóstico, em alguns casos, possa ser feito apenas com base em critérios clínico epidemiológicos, os testes laboratoriais são indispensáveis para o diagnóstico diferencial entre LT e demais dermatoses infecciosas (MARTINS et al., 2014).

O principal mecanismo de defesa contra a leishmaniose é a resposta imune associada às células T (REIS et al.,2007; ALMEIDA; SANTOS, 2011). Diversos estudos estão 16 concentrados na avaliação da expressão intralesional de quimiocinas e citocinas nas mais diversificadas formas clínicas da Leishmaniose (BOUSSOFFARA et

al.,2019). Na LT, a resposta imune é complexa, não havendo relação entre a resposta de células T helper 1 (Th1) e proteção contra doença. Tendo em vista que pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa causadas pela *Leishmania braziliensis* exibem intensa resposta celular e ainda assim desenvolvendo a doença. A produção exacerbada de IFN- γ e TNF- α está associada à patogênese da leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa (ALMEIDA; SANTOS, 2011).

Durante a defesa imune inata, as principais células envolvidas neste mecanismo são os neutrófilos, mastócitos, Natural Killer (NK) e monócitos. E, também, as células apresentadoras de antígenos (APCs) como células dendríticas e macrófagos, célula hospedeira de caráter primário para *Leishmania* (OLIVEIRA et al., 2021; SCOTT E NOVAIS, 2016).

Deste modo o presente estudo visa avaliar as células envolvidas no infiltrado inflamatório - macrófagos, linfócitos T e células dendríticas nas lesões de leishmaniose tegumentar humana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRICO

Há relatos e descrições da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) desde o século I d.C. Nas Américas, foram identificadas cerâmicas pré-colombianas, do Peru e do Equador, datadas 400 a 900 anos d.C., confeccionadas pelos índios do Peru, que exibiam mutilações de lábios e narizes, hoje conhecidos como leishmaniose cutâneo-mucosa (BASANO; CAMARGO, 2004; MOTA; MIRANDA, 2011).

A primeira referência de LTA no Brasil foi relatado no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado –Antiguidad de la Syphilis en el Perú", donde describe a viagem realizada pelo Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga (AM) até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônico (BASANO; CAMARGO, 2004).

Os achados históricos indicam que antes de acometer a população Europeia e Africana, a LTA já se manifestava nos povos da América. Supostamente acredita-se que sua origem se deu na área amazônica ocidental, intermediada por migrações humanas, ascendida posteriormente à selva alta, seguida às terras quentes interandinas, pelos limites territoriais da Bolívia e do Peru com o Brasil (MOTA; MIRANDA, 2011).

2.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS GERAIS

As leishmanioses são infecções parasitárias crônicas, não contagiosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* sp., transmitida a partir da picada de flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia*, naturalmente infectada (OYAMA et al., 2018; ALMEIDA; SANTOS, 2011). Integram ao grupo de doenças infecciosas negligenciadas, tendo em vista sua ocorrência em países mais pobres, atingindo as populações mais vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde (OPAS/OMS, 2019). São consideradas endêmicas em grande parte dos trópicos, subtropicais e na bacia do mediterrâneo, acometendo mais de 98 países (AKHOUNDI et al., 2016).

Tais infecções, podem resultar em amplo espectro de manifestações clínicas as quais são definidas a partir da interação existente entre a espécie do parasito, características do hospedeiro e a resposta imune do indivíduo infectado (ALMEIDA;

SANTOS, 2011; VIANA et al., 2013; FRAGA et al., 2012).

Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma antroponose que acomete cartilagens, mucosas e pele, de evolução crônica, de forma localizada ou difusa (REIS et al., 2007; BASANO; CAMARGO, 2004). Classificada clinicamente como: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e Leishmaniose Mucocutânea (LMC) (TALES; FONSECA; GONÇALVES, 2019; AKHOUNDI et al., 2016). O período de incubação da forma cutânea da infecção varia de uma a 12 semanas, com lesões nas mucosas geralmente aparecendo de um a dois anos após seu início (MARTINS et al., 2014). O envolvimento da mucosa nasal, palato, faringe, laringe e cordas vocais pode ocorrer em até 5% dos pacientes (ALMEIDA; SANTOS, 2011).

2.3 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

A LTA, classifica-se como doença infecto parasitária, sendo uma das cinco de maior relevância para a saúde pública no mundo. Por se tratar de uma doença negligenciada, ocorre em países pobres, atinge indivíduos vulneráveis e sem acesso aos serviços sociais e de saúde (ABRAÃO et al., 2020). Devido ao elevado índice de coeficiente de detecção e propensão de ocasionar deformidades (BRASIL, 2017), interfere também no âmbito psicológico, social e econômico dos pacientes, visto que na maioria dos casos é considerada uma doença ocupacional (BRASIL, 2019).

Apresenta distribuição global ampla, notificadas em mais de 80 países, acometendo principalmente os continentes da África, Ásia e Américas com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de casos novos (BRASIL, 2017; BRASIL, 2019). Aproximadamente 90% dos casos na América são registrados no Brasil, Bolívia e Peru. No Brasil, a LTA é uma das afecções dermatológicas de ampla magnitude, de notificação compulsória, com casos confirmados de autoctonia em todas as unidades federativas, em especial na Região Norte (BRASIL, 2019; ABRAÃO et al., 2020).

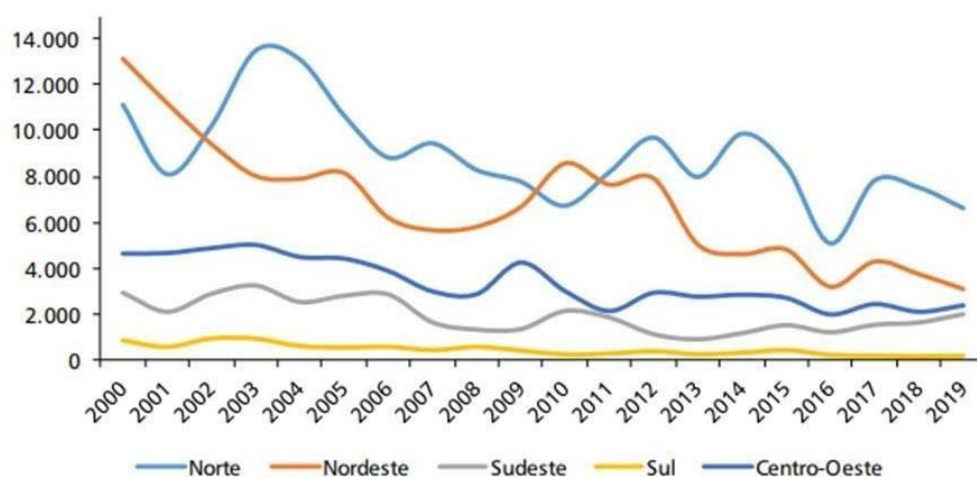
Entre 2003 e 2018 foram registrados mais de 300.000 casos, com média de 21.158 casos/ ano (BRASIL, 2019). Em 2018 no território nacional foram notificados 17.950 casos de LT, aproximadamente 94,42% expressaram a forma clínica cutânea. Dos casos notificados no Brasil, 4.415 (24,6%) corresponderam a região Nordeste sendo 320 casos correspondentes ao estado de Pernambuco e 26 à capital Recife (BRASIL, 2019).

A região Norte foi responsável pelos maiores coeficientes de detecção durante o

período, seguida da região Centro-Oeste. O coeficiente médio de detecção foi de 11,3 casos por 100.000 habitantes, variando de 5,7 – 17,8 (BRASIL, 2019).

Em 2019, 15.484 novos casos foram confirmados no Brasil, com coeficiente de detecção de 7,37 casos a 100 mil habitantes. (BRASIL, 2021) (**Figura 1**). No mesmo ano no estado de Pernambuco foram confirmados 329 casos, sendo que 313 corresponderam à forma clínica cutânea e 16 à forma mucosa. Dos 29 casos confirmados em Recife, 23 corresponderam à forma cutânea e 6 à mucosa (BRASIL, 2021).

Figura 1 - Estratificação de risco da Leishmaniose Tegumentar por município de infecção. Brasil, 2000 a 2019. Sendo a região Norte mais afetada (BRASIL, 2021).



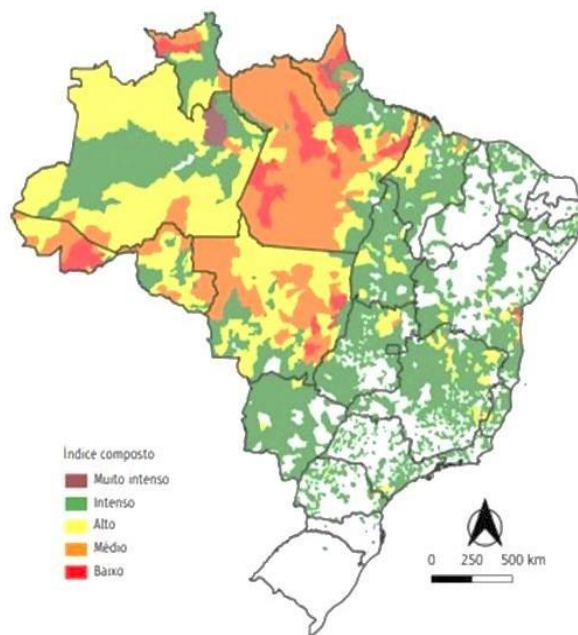
Fonte: Sinan/Ministério da Saúde, (2021).

A LT afeta principalmente os adultos jovens de 20 a 49 anos (54,9%), do sexo masculino (75,2%). Do total de casos notificados em 2019, 5,3% corresponderam à forma mucosa. 81,8% dos casos foram confirmados por algum tipo de diagnóstico laboratorial e em 0,9% houve registro de coinfeção com HIV. Do total de pacientes notificados em 2019, 67,1% evoluíram para cura clínica, enquanto 1,9% abandonaram o tratamento. Foram registrados, ainda, 19 óbitos por LT e 60 óbitos por outras causas (BRASIL, 2021).

A classificação epidemiológica dos municípios com transmissão de LT no Brasil é executada com base na metodologia proposta pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), que propôs o Índice Composto de Leishmaniose Tegumentar (ICLT), tal indicador baseia-se no número absoluto de casos novos e o coeficiente de

detecção da doença nos últimos três anos, classificando as áreas de transmissão em cinco estratos (muito intenso, intenso, alto, médio e baixo) **Figura 2**.

Figura 2 -Estratificação de risco da Leishmaniose Tegumentar por município de infecção. Brasil, no intervalo de 2017 a 2019 (Sinan / MS ,2021).



Fonte: Sinan/Ministério da Saúde, (2021).

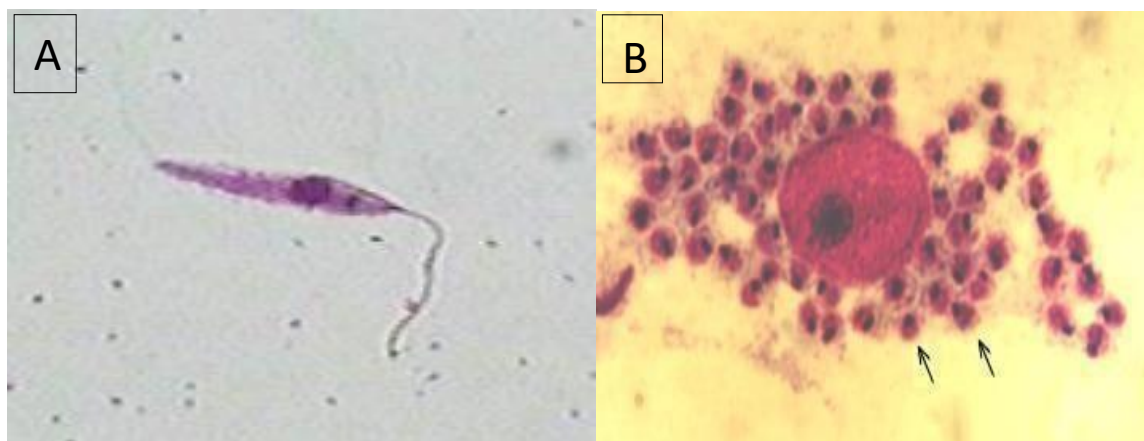
2.4 AGENTE ETIOLÓGICO E VETOR

A *Leishmaniaspp.* pertence à família Trypanosomatidae, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocitário mononuclear (BRASIL,2017), a princípio causam infecção de caráter zoonótico, de forma secundária acomete o homem e animais domésticos (BASANO; CAMARGO, 2004). A *Leishmania* apresenta-se sob duas formas principais: Promastigota, forma flagelada encontrada comumente no tubo digestivo do inseto vetor e amastigota, observada nos hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2017; REIS et al., 2007), internamente aos vacúolos lisossomais das células fagocitárias (ALMEIDA et al., 2003).

As promastigotas são alongadas, com um flagelo livre e longo, emergindo do corpo do parasito na sua porção anterior. Exibem diversidades nas dimensões corpóreas, cujos diâmetros podem ser observados entre 10,0 - 40,0 x 1,5 - 3,0 μm . O flagelo sempre apresentará medidas iguais ou superiores ao maior diâmetro do corpo. As formas infectantes dos hospedeiros vertebrados são as promastigotas metacíclicas, possuem os diâmetros do corpo nos menores limites apresentados pelos promastigotas e o flagelo muito longo, equivalente ao dobro do comprimento corporal (NEVES, 2016).

Na forma amastigota não há flagelo livre, ou seja, não há exteriorização para além do corpo do parasito, ele localiza-se na bolsa flagelar, resultante da invaginação da membrana na região anterior do corpo. Sua porção intracitoplasmática raramente é observada. Os limites micrométricos de seus diâmetros são de aproximadamente 1,5 a 3,0 x 3,0 a 6,5 μm (NEVES, 2016). Tal forma, parasita o sistema linfomonocitário, onde aloja-se nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos onde habitam e sofrem multiplicação por meio de divisão assexuada, até a lise celular, onde disseminam-se pelas vias hematogênica e linfática. Desencadeando uma reação inflamatória, proporcionando a atração de outros macrófagos, gerando desta forma um ciclo infeccioso contínuo e duradouro (BASANO; CAMARGO, 2004).

Figura 3 -Forma promastigota (A) e amastigota no interior de macrófagos (B) de *Leishmania* sp.



Fonte: <http://www.ufrgs.br/parasite/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Leishmania.htm>

Atualmente nas Américas, são reconhecidas 12 espécies dermatrópicas de *Leishmania* responsável pela doença em humanos e oito espécies descritas apenas animais. Entretanto, já foram identificadas sete espécies no Brasil, das quais, seis

pertencem ao subgênero *Viannia* e uma ao *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas nas regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2017)(**Tabela 1**).

Tabela 1 -Principais subgêneros causadores da leishmaniose tegumentar e sua distribuição no território nacional.

Subgêneros da <i>Leishmania</i> sp.	Distribuição Territorial
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	Distribui-se pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e sudoeste do Maranhão). Sendo encontrada também na região do Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-oeste (Goiás).
<i>Leishmania (Viannia) guyanensi</i>	Aparentemente limita-se à região norte da Bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará), ampliando-se pelas Guianas.
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Distribuição ampla, do sul do Pará ao Nordeste, atingindo o centro-sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental.

Fonte: Adaptado MOTA; MIRANDA, 2011.

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* foi a primeira espécie descrita que é incriminada como agente etiológico da LT. É a mais importante, não só no Brasil, mas em toda a América Latina. Tem ampla distribuição, desde a América Central até o norte da Argentina. Esta espécie está amplamente distribuída em todo País (BRASIL, 2017).

A transmissão ocorre a partir da picada de flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia*, naturalmente infectada (OYAMA et al.,2018; ALMEIDA; SANTOS, 2011) popularmente conhecidos por mosquito palha (**Figura 4**), tatuquira, birigui, asa branca, cangalhinha entre outros, a depender da região geográfica (BRASIL,2017;BASANO; CAMARGO, 2004).

Figura 4 -Flebotomíneo, vetor da leishmaniose, conhecido também como mosquito palha.



Fonte:<https://g1.globo.com/ro/rondonia/natureza/amazonia/noticia/2019/12/06/pesquisadores-de-rodoscobrem-especie-de-mosquito-palha-que-pode-fazer-parte-do-grupo-transmissor-da-leishmaniose.ghtml>

No velho Mundo, geograficamente, os casos de LT restringem-se às áreas áridas e semi-áridas das regiões do Norte, Subsaariana Central e África Oriental; o Oriente Próximo e Oriente Médio; e Ásia Central e Índia. Os agentes etiológicos incluem: *L. tropica*, *L. maior*, e *L. aethiopica*. No Novo Mundo, ocorre em áreas tropicais e subtropicais do México e da América Central e do Sul, os principais vetores pertencem aos subgêneros *Nyssomyia*, *Psychodopygus*, *Lutzomyia* e *Verrucarum* (AKHOUNDI et al., 2016). No Brasil as espécies envolvidas na transmissão são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. migonei* (BRASIL, 2017).

2.5 CICLO BIOLÓGICO – Vetor e Hospedeiro

Os ciclos variam de acordo com a região geográfica que incluem diversidade de espécie do parasito, vetor, reservatório e hospedeiros (BRASIL, 2017).

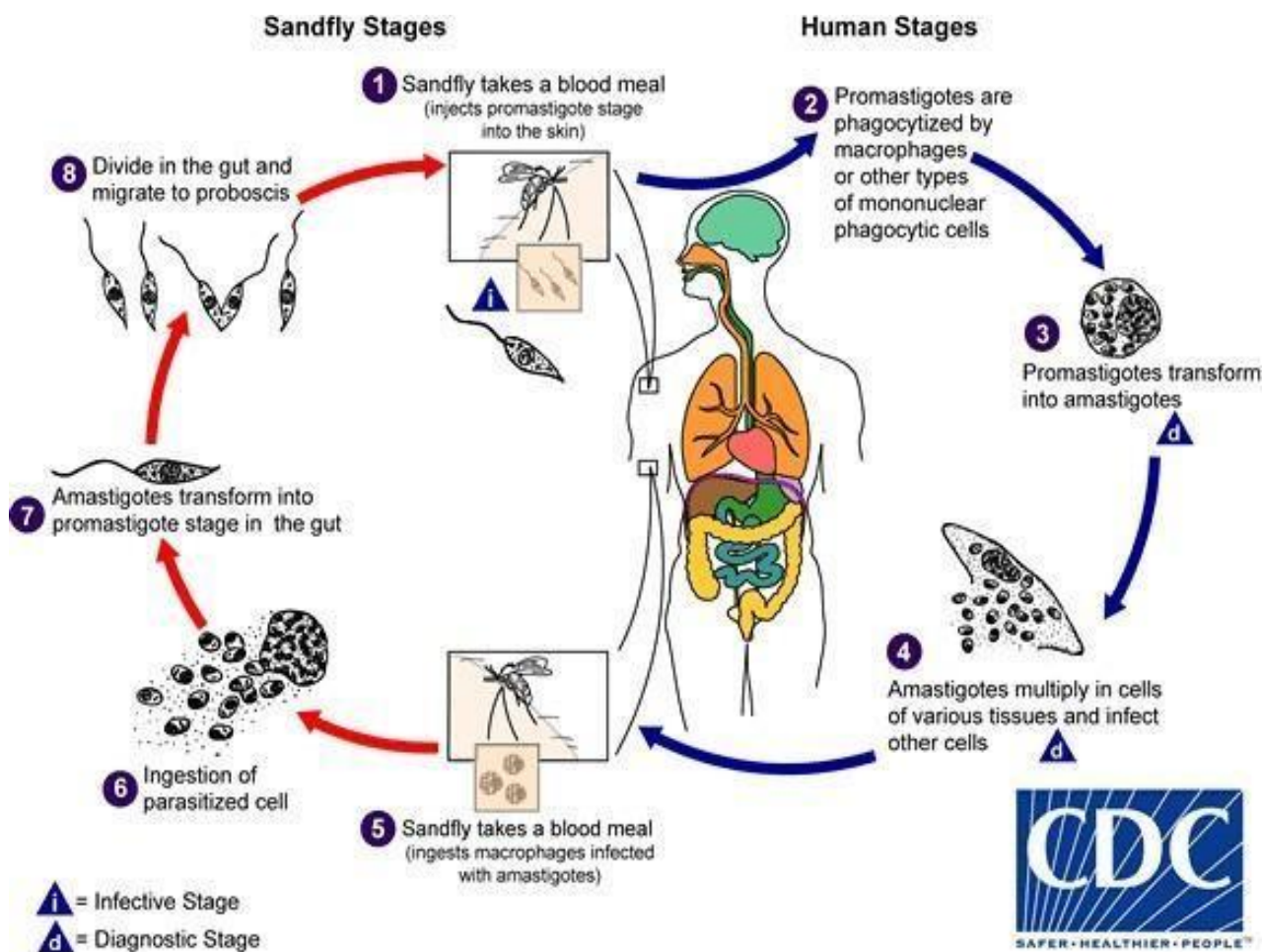
A infecção dos hospedeiros vertebrados dá-se pela inoculação das formas promastigotas metacíclicas por intermédio dos flebotomíneos fêmeas infectados no decorrer do repasto sanguíneo. A internalização da *Leishmania* se faz através da endocitose mediada por receptores na superfície do macrófago. Posteriormente, o promastigota metacíclico é encontrado no interior do vacúolo parasitóforo. A promastigota transforma-se em amastigota, capaz de desenvolver e multiplicar no meio ácido encontrado no vacúolo digestivo. Mantendo o controle das condições ambientais internas do vacúolo, a amastigota inicia o processo de sucessivas multiplicações. Na

ausência do controle parasitário pela célula hospedeira, estas se rompem e as amastigotas são liberadas, dando início a uma reação inflamatória local, com invasão de novas células do sistema fagocítico mononuclear, gerando novos ciclos do parasito (**Figura 5**). Em seguida, ocorre disseminação do parasito pelas vias hematogênica e linfática para outros compartimentos como as mucosas e as vísceras (BASANO; CAMARGO, 2004).

Ao ingerir o sangue humano infectado contendo macrófagos parasitados pelas formas amastigotas, eles são direcionados até atingirem trato digestório anterior ou ao estômago, onde se rompem e as amastigotas são liberadas. Provavelmente a forma amastigota sofre divisão binária antes de transformar-se em promastigota, na qual passam por sucessivas divisões celulares. Entre o terceiro e quarto dia, após o processo digestivo sanguíneo, a membrana peritrófica se rompe e as variáveis formas promastigotas são liberadas. Essa diversidade (procíclica, nectomona, haptomona, leptomona, metacíclica) está atrelada aos diversos papéis estabelecidos na infecção, bem como a manutenção.

As promastigotas procíclicas a depender da espécie do parasito infectante podem seguir caminhos distintos. Quando pertencente ao subgênero *Viannia* segue para o intestino posterior (seção peripilário – piloro e íleo), posteriormente ocorre a migração por meio do estômago em direção a faringe do vetor, passando pelo processo de metaciclogênese, no qual as formas promastigotas atingem o estágio infectivo. As pertencentes ao subgênero *Leishmania* multiplicam-se, sejam aderidas à parede estomacal ou livremente, e posteriormente sucede a migração dos flagelados para a região anterior do estômago, transformando-se em promastigotas nectomonas. O tempo do ciclo é variável, 7 a 12 dias, a depender principalmente da espécie de *Leishmania* envolvida (NEVES, 2016).

Figura 5 - Ciclo evolutivo da *Leishmania sp.* nos hospedeiros vertebrados e invertebrados.



Fonte: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

2.6 RESPOSTA DO HOSPEDEIRO

2.6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES

A LTA é expressa em diversas formas clínicas, ao qual está intimamente relacionada a espécie parasita da *Leishmania* e o sistema imune do hospedeiro. As lesões variam de cutâneas auto-limitadas a formas mucocutâneas desfigurantes (MURBACK et al., 2011). A lesão ulcerada, típica da LT, é normalmente indolor e apresenta forma arredondada ou ovalada, base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; tem bordas bastante delimitadas e elevadas com interior avermelhado e granulações grosseiras.

Quando associada a infecção pode resultar em dor localizada e exsudato seropurulento (BRASIL, 2017).

As manifestações clínicas das lesões cutâneas são classificadas em localizadas, disseminadas e difusas. Forma cutânea localizada, corresponde a primeira ocorrência do tegumento. Lesões geralmente ulceradas com predisposição a cura espontânea, podendo ser única ou múltipla. pode acompanhar-se de linfadenopatia regional e de linfangite nodular e costuma apresentar Intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva (BRASIL, 2017).

A lesão cutânea disseminada é a expressão incomum, pode ser identificada em apenas 2% dos casos. Apresenta-se múltiplas lesões papulares, pequenas e acneiformes que acometem diversos segmentos corporais. A *Leishmania (V.) braziliensis* é a principal causadora desta síndrome. A disseminação provavelmente decorre da disseminação do parasito pelas vias linfáticas ou hemática. Normalmente, acomete pacientes imunodeprimidos (BRASIL, 2017; MURBACK et al., 2011).

A forma cutânea difusa caracteriza-se por ser a forma mais rara e grave, causada no Brasil pela *L. (L.) amazonensis*. Decorre em pacientes com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* e energia. Inicia com lesão única que evolui lentamente por intermédio da disseminação linfática do parasita. As lesões apresentam formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas o qual recobre grandes extensões cutâneas. Tal forma, associa-se a resposta imune deprimida que culmina no quadro de anergia imunológica (BRASIL, 2017; MURBACH et al., 2011).

Figura 6 - Manifestação clínica das lesões cutâneas. **A** – Lesão cutânea localizada única, com bordas elevadas e arredondadas e fundo granulomatoso. **B**- Lesão cutânea múltipla, ulcerada, com bordas elevadas, infiltrada, fundo granuloso. **C** - Forma cutânea disseminada: Lesões primárias ulceradas, com bordas elevadas e fundo granulomatoso. **C 1** – Mesmo paciente da figura C, verifica-se a presença de lesões múltiplas, com algumas ulcerações superficiais. **D** e **E** – Lesões cutânea difusa.



Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana - 2017

O encontro do parasito na forma disseminada é baixo quando comparado com a forma difusa, forma da qual também se diferencia pela presença de IDRMs positivas e ulcerações (BRASIL, 2017).

As lesões cutâneas, caso não tratadas, podem progredir a cura espontânea, habitualmente deixam cicatrizes atróficas, deprimidas com superfície lisa, áreas de hipopigmentação e traves fibrosas. Podendo também passar despercebida pela pigmentação, forma, tamanho e posição ou tornar-se hipertróficas. Sendo capaz de continuar ativas por anos e coincidir com lesões mucosas posteriormente (BRASIL,

2017).

A leishmaniose mucosa ou cutânea mucosa (LM) está associada com a *L. braziliensis*, *L. panamensis* e menos frequente com a *L. amazonensis* (LESSA et al., 2007). Diferentemente dos estudos anteriores, o ensaio realizado na região amazônica afirma que a *L. (V.) guyanensis* apresenta índices significativos na forma mucosa (GUERRA et al., 2011).

Embora a região nasal seja a mais comumente afetada, outras áreas tais quais lábios, boca, faringe e laringe também podem ser acometidos (LESSA et al., 2007). Estas lesões de LM podem ser identificados a presença de eritema, infiltração, erosão e ulceração com fundo granuloso. Caso haja infecção secundária as lesões podem apresentar-se recobertas por exsudato mucopurulento e crostas. Na mucosa do nasal, pode haver desde perfuração a destruição do septo cartilaginoso. Na região oral, pode acontecer perfuração do palato mole (DVDT, SVS/MS 2017).

A LM manifesta-se sob as seguintes formas clínicas: tardia, isolada, concomitante, contígua e primária.

A leishmaniose mucosa tardia é a manifestação mais frequente. Geralmente está associada ao processo de cicatrização da LC. Caracteriza-se por apresentar lesões múltiplas de mucosa interna (BRASIL, 2017; MARZOCHI E MARZOCHI, 1994); na isolada ou origem indeterminada, não é possível detectar nenhuma outra evidência de LC prévia, ou seja, não há presença de cicatrizes ativas de LC. Provavelmente devido a evolução rápida das lesões, por serem pequenas e não apresentarem ulcerações (DVDT, SVS/MS 2017; MARZOCHI E MARZOCHI, 1994).

Na forma concomitante, as lesões mucosas e cutâneas (ativa ou cicatrizada) ocorrem a distância, porém de forma simultânea (BRASIL, 2017; MARZOCHI E MARZOCHI, 1994). A Contígua, caracteriza pela propagação direta da lesão cutânea (cicatrizada ou ativa), nas proximidades dos orifícios naturais, para a mucosa das vias aerodigestivas (BRASIL, 2017; MARZOCHI E MARZOCHI, 1994). A primária, geralmente, é uma lesão única. Ocorre ocasionalmente pela picada do vetor na mucosa ou submucosa de lábios e genitais (BRASIL, 2017; MARZOCHI E MARZOCHI, 1994).

2.6.2 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

A histopatologia típica da LT consiste em dermatite granulomatosa difusa ulcerada. Outras doenças não infecciosas podem assemelhar-se clinicamente à LT:

neoplasias, doenças inflamatórias e doenças vasculares, entretanto apresentam achados histopatológicos distintos, sendo nesses casos, o aspecto histopatológico suficiente para diferenciá-lo (BRASIL, 2017).

No entanto, doenças infecciosas como sífilis, hanseníase, tuberculose, micobacterioses atípicas, paracoccidioidomicose, histoplasmose, lobomicose, esporotricose, cromoblastomicose, piodermite, rinoscleroma, granuloma facial de linha média, sarcoidose, lúpus eritematoso discóide, psoríase, infiltrado linfocítico de Jessner, vasculites, úlceras de estase venosa faz-se necessário a realizar diagnóstico diferencial (BRASIL, 2019).

Devido semelhança ao espectro histopatológico da LT, a busca pelo agente etiológico nos exames histopatológicos, meios de cultura, ensaio imuno-histoquímico, dentre outros métodos microbiológicos permite alcançar um diagnóstico mais preciso (BRASIL, 2017). Apesar das leveduras serem ausentes de cinetoplasto, pode ocorrer o confundimento entre as formas amastigotas de *Leishmania* e formas em levedura de *Sporothrix* sp. e de *Histoplasma capsulatum* (BRASIL, 2017).

As alterações histopatológicas gerais das lesões de LT consistem em um infiltrado inflamatório de células mononucleares, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e células plasmáticas a reações granulomatosas com ou sem necrose, podendo ser encontrada hiperplasia pseudoepiteliomatosa na epiderme (VIANA et al., 2013; VIANA et al., 2012). Embora o diagnóstico, em alguns casos, possa ser feito apenas com base em critérios clínico epidemiológicos, os testes laboratoriais são indispensáveis para o diagnóstico diferencial entre LT e demais dermatoses infecciosas e para confirmar o diagnóstico antes da administração de medicamentos anti-*Leishmania* (que têm vários efeitos colaterais potenciais) (MARTINS et al., 2014). As alterações dérmicas ou do córion da mucosa permitiram identificar cinco padrões histopatológicos: 1) Reação Exsudativa Celular - REC, constituída por um difuso infiltrado celular histiolinfoplasmocitário; 2) Reação Exsudativa e Necrótica - REN, caracterizada, principalmente, pela presença de áreas de necrose no seio do infiltrado inflamatório; 3) Reação Exsudativa e Necrótico-Granulomatosa - RENG, que corresponde ao quadro descrito como inflamação crônica granulomatosa associada às áreas de necrose; 4) Reação Exsudativa e Granulomatosa - REG, onde se observa uma reação granulomatosa desorganizada, ausência de necrose tecidual; 5) Reação Exsudativa e Tuberculóide - RET, caracterizada pelo granuloma tuberculóide (MAGALHÃES et al., 1986). As manifestações clínicas exibem polimorfismo correspondendo desde lesões

cutâneas simples, únicas ou múltiplas, ulceradas ou fechadas, até lesões mucosas degenerativas ou lesões cutâneas difusas não ulceradas, dependendo das características espécies-específicas do parasito e do tipo de resposta imune do hospedeiro (GONTIJO; CARVALHO,2003; MARTINS et al., 2014) e o espectro de gravidade dos sinais e sintomas variáveis (BRASIL,2017).

Comumente, a infecção afeta principalmente a pele. Visto que o parasito invade este órgão por meio da picada do flebotomíneo fêmea infectado, desencadeia a resposta imune inata, seguida da resposta imune mediada por células, onde participam de forma ativa na síntese do granuloma, limitando a disseminação do agente e, dessa forma realizando o controle da infecção (GONZÁLEZ et al.,2018).

2.6.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

A *Leishmania* apresenta mecanismos imunológicos que favorecem sua persistência e multiplicação frente ao hospedeiro, tais como: inibição de estímulos dos linfócitos Th1, promotor de citocinas como interleucina 2 e interferon gama, responsáveis pela defesa celular; redução das atividade celulares citotóxicas naturais (NK); diminuição da expressão de antígenos do complexo de histocompatibilidade principal classe II que dificulta o seu reconhecimento pelas células do sistema imune, e a inibição expressiva do óxido nítrico sintetase, que propicia a sobrevivência intracelular do parasito (SAMPAIO et al.,2002).

O principal mecanismo de defesa contra a leishmaniose é a resposta imune associada às células T (ALMEIDA; SANTOS, 2011; REIS et al., 2007). Há inúmeros estudos concentrados na avaliação da expressão intralesional de quimiocinas e citocinas nas mais diversificadas formas clínicas da Leishmaniose (BOUSSOFFARA et al.,2019). Na LT, a resposta imune é complexa, não havendo relação entre a resposta Th1 e proteção contra doença. Tendo em vista que pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa causadas pela *Leishmania braziliensis* exibem intensa resposta celular e ainda assim desenvolvendo a doença. A produção exacerbada de IFN- γ e TNF- α associada à patogênese das LC e LM (ALMEIDA; SANTOS, 2011).

Após a entrada do parasito no hospedeiro, por intermédio da picada do flebotomíneo, o sistema imune inato do tegumento induzirá duas vias frente ao combate do patógeno: o recrutamento de células inflamatórias no microambiente e o reconhecimento dos patógenos pelos fagócitos por meio da interação existente entre os

receptores de reconhecimento de patógenos e as proteínas associadas ao patógenos PPRs e Apcs, respectivamente (CONCEIÇÃO-SILVA et al.,2014;OLIVEIRA et al., 2021).

No decorrer da defesa imune inata, as principais células envolvidas neste mecanismo são os neutrófilos, mastócitos, Natural Killer (NK) e monócitos. E, também, as células apresentadoras de antígenos (APCs) como células dendríticas e macrófagos,célula hospedeira de caráter primário para *Leishmania* (SCOTT E NOVAIS, 2016; OLIVEIRA et al., 2021).

As células dendríticas (DCs) são de suma importância na resposta imune inata do tegumento,pois são responsáveis por iniciar localmente a resposta imune adaptativa das células T (SCOTT E NOVAIS, 2016).Estas células agem ativando, fazendo o reconhecimento, transporte e processamento dos patógenos (OLIVEIRA et al., 2021). Em suma, 31 migram para a região da derme,neste processo migratório essas células têm capacidade de sensibilizar os linfócitos T naive.No decorrer do processo de maturação,são responsáveis por induzir a expressividade de moléculas do MHC classes I e II e de moléculas co-estimulatórias B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), CD40 e CD83,sendo caracterizada como importante célula na síntese de linfocinas e potente estimulador da proliferação de células T específicas para *Leishmania major* (CONCEIÇÃO-SILVA et al.,2014; COSTA et al., 2021).

Inúmeros fatores são responsáveis pela maturação das CDs: Padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP); O equilíbrio entre os sinais das citocinas pró e anti-inflamatórios no ambiente de infecção, tais quais TNF, IL-6, IL-1, IL-10, TGF- β e prostaglandinas; Sinais derivados de células T.Há também associação com a família de receptores -Toll-likell (TLR), presentes nas CDs imaturas, macrófagos e células endoteliais (COSTA et al., 2021).

Os macrófagos são ativados pelo Fator de Necrose Tumoral e Interferon-gama por intermédio da expressão da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS). Tal enzima estimula o aumento da síntese óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio em macrófagos resultando na destruição do parasita.Estudos realizados em camundongos apontam que a deficientes em iNOS torna o organismo mais suscetível à infecção por *L. major*. O IFN- γ e outras citocinas inflamatórias como é o caso do TNF, são responsáveis por induzir a ativação dos macrófagos infectados culminam na produção do óxido nítrico (NO), as Th2 com suas citocinas relacionadas,tais quais as IL-4, IL-3 e IL-10, além da síntese de anticorpos, associa-se aos macrófagos alternativos, que acabam

suportando a sobrevivência do parasita no interior dos macrófagos, e uma possível não cura (OLIVEIRA et al., 2021).

Pacientes portadores de LC expressam forte resposta imune Th1, mediadas por células acompanhadas pela síntese de citocinas inflamatórias que corroboram no controle do parasito e na patogênese da doença. Comprovada por reação cutânea de hipersensibilidade positiva tipo IV e elevada síntese de IFN- γ por *Leishmania*. No entanto, tem-se evidências que a resposta imune Th2, está relacionada aos elevados níveis séricos de IgE e mRNA para IL-4, IL-5 e IL-10 em biópsias ulceradas de tegumento por *Leishmania* (SOUSA-ATTA et al.,2002).

De um modo geral, aceita-se que a principal diferença entre a susceptibilidade e a resistência por meio da infecção por *Leishmania* está associada aos níveis de expansão das células T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2) (REIS et al., 2007). A partir de modelos experimentais com diversas espécies de *Leishmania*, supõe que a resposta imunológica do Th1 está associada ao controle e à patologia do parasita, evento crucial promovendo a ativação dos macrófagos e consequentemente a destruição da infecção, evento crucial para indução da resposta imune curativa contra a *Leishmania* é efetiva ativação de células aptas a produzir citocinas que levam a ativação de macrófagos, via IFN- γ , resultando na morte dos parasitos intracelulares ; enquanto a resposta Th2 está associada à suscetibilidade à doença. Havendo regulação negativa induzida na secreção de citocinas Th1 interleucina (IL) -12 e interferon (IFN) - γ com um aumento simultâneo na produção de citocinas Th2 interleucina (IL) -4, IL 5 e IL-10, sugerindo desequilíbrio generalizado na função linfocitária (GONTIJO;CARVALHO, 2003; ALMEIDA; SANTOS,2011; VIANA et al., 2013).

Nas lesões de LTA causadas por *L. braziliensis* ou *L. mexicana*, foi sugerida uma função efetora pelas citocinas e/ou mediadores citotóxicos sintetizados por células CD4 ou CD8. Embora a envoltura ativa das células T CD8 na resposta imune a infecções cutâneas em humano, seu papel ainda é controverso. Enriquecimento de células T CD8 reativas a *Leishmania* em lesões antigas implica em papel importante no processo de cicatrização(BOUSSOFFARA et al.,2019).

A resposta imunológica dentre outros fatores,também pode variar de acordo com a predisposição genética e o estado de imunossupressão do hospedeiro.Na literatura já tem sido relatada a ocorrência de LTA em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Observa-se na infecção pelo HIV, que há uma desregulação do sistema imune, com alteração da resposta celular Th1 para a humoral

tipo Th2, proporcionando cenário bastante favorável para a replicação e propagação de organismos intracelulares, como é o caso da *Leishmania* (SAMPAIO et al., 2002).

2.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A utilização de métodos laboratorial objetiva não somente à confirmação dos achados clínicos, mas fornece importantes dados epidemiológicas, como a identificação da espécie de *Leishmania* circulante, por exemplo, para orientar quanto às medidas a serem adotadas para o controle do agravo (BRASIL, 2017).

O diagnóstico precoce e preciso é necessário para a determinação de um tratamento eficaz, pois impede a progressão de uma doença crônica, que a depender, pode culminar em lesões desfigurantes ao indivíduo. Normalmente, a diagnose de LCM e LC baseia-se na análise microscópica ou cultura de parasitas a partir de biópsias ou aspirados de lesões suspeitas de LT; sendo a cultura parasitária método de diagnóstico muito demorado e trabalhoso. Em regiões endêmicas a LC é comumente diagnosticada por meio das avaliações epidemiológicas e clínica (MEIDE et al., 2005).

Um diagnóstico laboratorial definitivo só é possível quando a espécie do parasita é identificada por meio de exame de lâmina tecidual, cultura em meio específico e inoculação de hamster, além de exames histopatológicos e análise de reação em cadeia da polimerase (PCR). Métodos imunológicos indiretos, como a reação intradérmica de Montenegro e a sorologia indireta por imunofluorescência, também podem ajudar na confirmação diagnóstica (ALMEIDA; SANTOS, 2011; MARTINS et al., 2014).

A sensibilidade dos meios utilizados pode sofrer variações conforme a qualidade dos equipamentos e insumos utilizados, forma clínica, tempo evolutivo das lesões e espécie envolvida (BRASIL, 2017).

Dentre os métodos imunológicos destacam-se ensaio imunoenzimático (ELISA); a Sorologia por imunofluorescência (IFI) o qual apresenta sensibilidade aproximadamente de 70% em lesões ulceradas por *L. (V.) braziliensis* no primeiro ano da manifestação clínica da doença e o Teste intradérmico (Intradermorreação de Montenegro ou da *Leishmania*) que consiste em reação de hipersensibilidade celular tardia. Técnica utilizada na detecção da doença ativa, diagnóstico retrospectivo e inquéritos epidemiológicos, devido a eficácia dos resultados obtidos. Sendo considerado de suma importância no âmbito clínico e na pesquisa. Embora amplamente aceito pelos

profissionais ,as diferenças existentes na preparação comercial, podem prejudicar a detecção das diferentes formas de leishmaniose e sua antigenicidade (JOSÉ et al., 2001) Os exames parasitológicos- Demonstração direta do parasito; Isolamento em cultivo in vitro (meios de cultivo) e Isolamento in vivo (inoculações animais); visa a identificação da forma amastigota em esfregaço da lesão ou imprint de fragmentos de tecido do paciente (BRASIL,2019). O método molecular mais utilizado é a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), apresenta alta sensibilidade e especificidade, faz uso de distintos alvos moleculares, uns de gêneros-específicos e outras espécies específicas. Baseia-se na amplificação do DNA parasitário. Possibilita a detecção de DNA do parasito mesmo quando existe baixa carga parasitária (BRASIL, 2017).

2. 8 TRATAMENTO

Os antimoniais pentavalentes (Sb^V) são fármacos de primeira escolha para todas as formas de leishmaniose. Apresenta atividade antiparasitária,por meio da inibição da atividade da topoisomerase. As topoisomerasespertencem ao grupo de enzimas que são responsáveis por controlar a homeostase topológica do DNA no decorrer dos processos de replicação, transcrição e condensação da cromatina. Na *Leishmania*, a enzima encontra-se no núcleo e na mitocôndria. Há diferenças bem esclarecidas na estrutura e expressão destas enzimas no parasito e hospedeiro, demonstrando elevado potencial terapêutico dos inibidores topoisomerase como droga com atividade leishmanicida. A inibição da adenosina trifosfato (ATP) e da guanosina trifosfato (GTP) através da inibição do ciclo do ácido cítrico e da glicólise já foi proposta como mecanismo de ação (SANTIAGO et al, 2021).

O Sb^V , pró fármaco, ao qual converte-se na forma ativa trivalente (Sb^{III}) sob condições de pH básico nos fagocitos do hospedeiro.Tal mecanismo de ação , gera toxicidade tanto contra o parasita quanto ao hospedeiro (SANTIAGO ,et al 2021) ,tais medicamentos são portanto administrada via intramuscular (IM) ou intravenosa (IV).

Atualmente, há dois complexos de antimoniais pentavalentes disponíveis comercialmente: o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®,sendo este último não comercializado nacionalmente (BRASIL, 2017; SANTIAGO et al, 2021). No Brasil, o medicamento de primeira escolha é o Glucantime ®.

A OMS recomenda que a dose seja calculada em miligramas de antimônio pentavalente (Sb+5) por quilograma de peso corporal por dia (mg Sb+5/kg/dia). O antimonial pentavalente pode ser utilizado no tratamento de todas as formas clínicas da LT (BRASIL, 2017). O uso dos antimoniais pode resultar em dores abdominais, vômito, diarreia, náusea, cefaleia, fadiga, febre, tosse, erupção cutânea, pancreatite, pneumonia, insuficiência hepática, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade (SANTIAGO et al, 2021).

Em 2016 incorporou-se em associação ao antimoniato de meglumina, droga de primeira escolha, à pentoxifilina em pacientes maiores de 12 anos, visando reduzir a taxa de toxicidade (BRASIL, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar as células envolvidas no infiltrado inflamatório - macrófagos, linfócitos T e células dendríticas nas lesões de leishmaniose tegumentar humana.

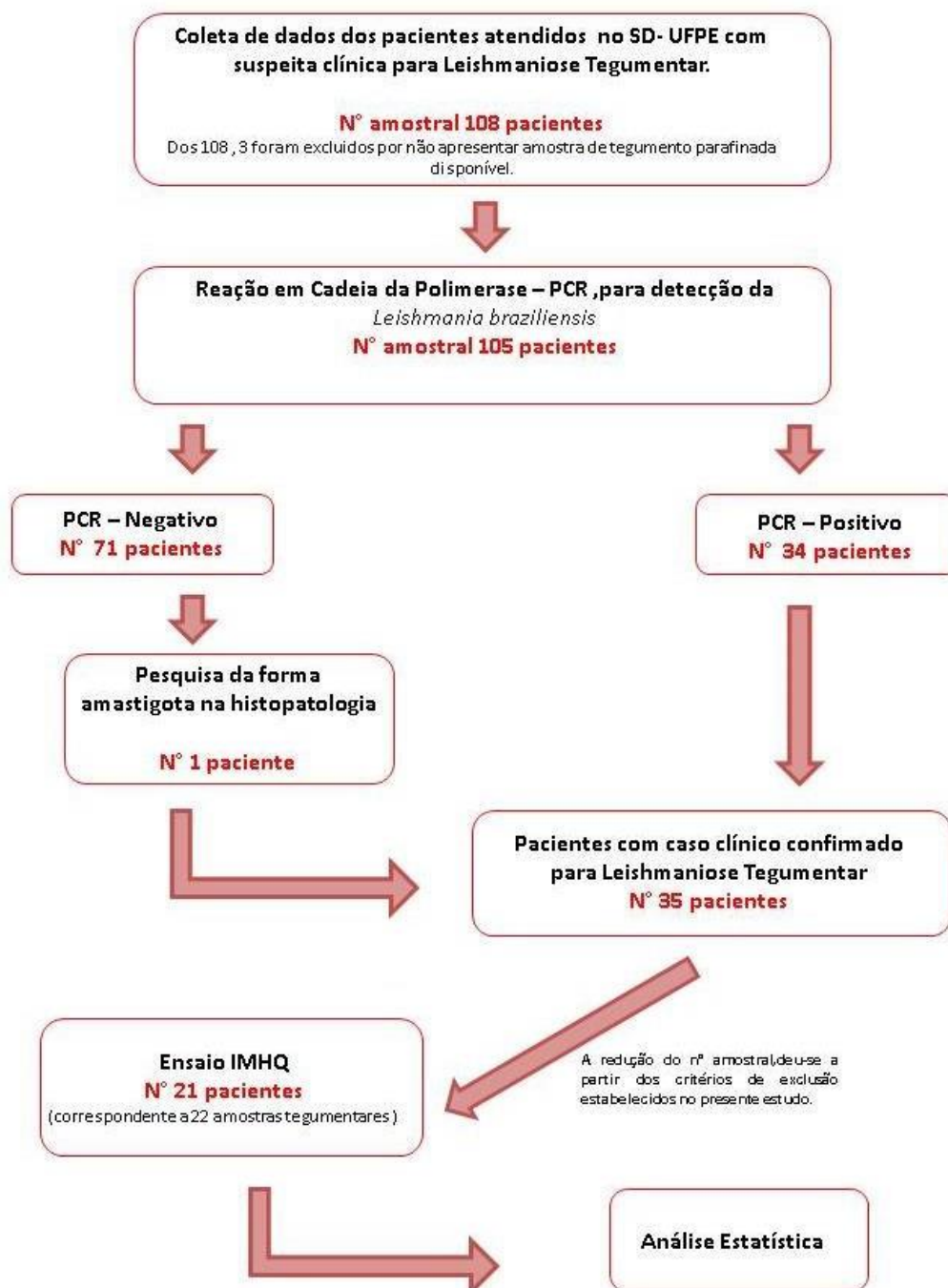
3.2 Específicos

- Caracterização dos pacientes com lesões suspeitas de leishmaniose tegumentar;
- Descrever as alterações histopatológicas causadas por *Leishmania braziliensis*;
- Identificar por métodos moleculares, PCR e eletroforese, a espécie *Leishmania braziliensis* presentes nas lesões;
- Semi quantificar as células marcadas no sítio inflamatório com anticorpos monoclonais CD68, TCD4⁺ e CD123⁺ para marcação de macrófagos, células T CD4⁺ e dendríticas, respectivamente;

4 MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Figura 7 – Fluxograma do desenho experimental e população do estudo para leishmaniose tegumentar



Fonte: autora (2021).

Trata-se de um estudo de retrospectivo e prospectivo, transversal do tipo observacional, envolvendo biópsias de pele de pacientes atendidos no Serviço de Dermatologia da Universidade Federal de Pernambuco (SD – UFPE), com suspeita clínica de leishmaniose tegumentar, a base de dados foi referente ao período de janeiro de 2016 a dezembro de 2019.

Foram analisados os perfis clínicos e laboratoriais através dos prontuários e relatórios anatomopatológicos dos pacientes que tiveram as biópsias de fragmento de tegumento coletadas no SD - UFPE, com quadro sugestivo de LT (**Figura 7**).

As amostras de biópsia de pele parafinadas previamente coletadas no serviço de Dermatologia de pacientes com suspeitas de LT foram investigadas por método molecular e histopatológicos e em seguida submetidas a realização de ensaio imunohistoquímico para investigação do sítio inflamatório com anticorpos monoclonais CD68, TCD4+ e CD123+ para marcação de macrófagos, células T CD4+ e dendríticas.

Os pacientes que não apresentaram diagnóstico clínico e/ou anatomopatológico favorável a LT; A inexistência / insuficiência de amostras teciduais em blocos de parafina no SD - UFPE; Negatividade para o DNA de *Leishmania* no ensaio molecular por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR); Presença da forma amastigota foram excluídos do presente estudo.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E ANATOMOPATOLÓGICO

O diagnóstico clínico deu-se a partir da análise macroscópica das biópsias cirúrgicas de tegumento, fixadas em formol a 10%, descrita nos prontuários dos pacientes que apresentam lesões características de infecção por LT. As manifestações clínicas exibem grande polimorfismo, o qual depende das características específicas do parasito e do tipo de resposta imune do hospedeiro (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARTINS et al., 2014).

Tipicamente as lesões de LT foram caracterizadas por serem normalmente indolores, de aspecto arredondado ou ovalado, base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; bordas bastante delimitadas e elevadas com interior avermelhado e granulações grosseiras. Podendo ou não ser recobertas por exsudato sero purulento, neste último caso, quando está presente, é acarretado da associação de infecção

bacteriana, podendo resultar em dor localizada (ALMEIDA; SANTOS, 2011; DVDTSVS/MS 2017).

Após análise macroscópica relatada na ficha de acompanhamento dos pacientes, as amostras foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Em seguida, realizou-se o corte do material em secções de 3-5 µm de espessura. Na coloração dos cortes empregaram a técnica de hematoxilina-eosina (H.E), na tentativa de se buscar formas amastigotas de *Leishmania* do interior de macrófagos através de microscopia óptica sob imersão (1000x). As etapas descritas, foram utilizadas pelos profissionais responsáveis na preparação das amostras suspeitas para leishmaniose tegumentar. Posteriormente as amostras foram analisadas pelos dermatologistas e patologistas atuantes no SD - UFPE, após análise os achados encontrados foram descritos nos prontuários dos pacientes.

4.2.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

4.2.2.1 Extração do dna dos fragmentos de biópsias parafinizadas

O DNA genômico foi extraído de embebido em parafina conforme descrito (ROCHA et al., 2018) e as recomendações do protocolo do fabricante (ReliaPrep™ Total Nucleic Acid Purification Kit, Promega®, Madison, EUA). A desparafinização das amostras de biópsia tegumentar foi realizada através do aquecimento dos cortes em lâminas sobrepostas em agitador magnético com aquecimento para o derretimento da parafina. Em seguida, foi adicionado 200µL de tampão de lise (Cell Lysis Buffer) e 20µL proteinase K (pK),agitado brevemente em um vórtex por dez segundos,e em seguida submetidos a temperatura de 56°C por um período de 12h. Após o tempo de incubação, o material foi extraído de acordo com o kit. Foi adicionado o tampão de ligação (Binding), em seguida as amostras foram transferidas para as colunas e submetidas a uma centrifugação de 14.000 rpm por 1 minuto. Depois foi adicionado à solução de lavagem (Column wash solution). O DNA foi eluído com a água livre de nucleases.O DNA extraído foi quantificado pelo Thermo Nanodrop 2000c spectrophotometer. A concentração final de DNA foi ajustada a 20 ng, para amplificação pela técnica de PCR.

4.2.2.2 Amplificação de DNA de *L. braziliensis* pela ITS1 -PCR

A PCR ITS1 foi preparada contendo 12,5 µL 2X TopTaq Master Mix (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, usando LITSR 5'-CTGGATCATTTCCGATG-3' e L5.8S 5'-TGATACCACTTATCGCCACTT-3', amplificando uma porção da região não codificadora do espaçador transcrito interno 1 (ITS1) encontrada no rRNA SSU delimitado pelos genes 5.8S e 18S de variando de 300 a 350 pb, para um volume total de 25 µL. O protocolo da ciclagem utilizado foi: Desnaturação inicial de 95°C a 3 min. Seguidos de 35 ciclos de desnaturação 95°C a 40s, anelamento 53°C a 45s, extensão 72°C a 1 min e uma extensão final de 72°C a 6 min (Schonian et al., 2003).

Foi utilizado como controle positivo o DNA de *L. braziliensis* MHOM/BZ/75/M2903 em meio Schneider. Estes foram obtidos no Laboratório de Parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (IAM-FIOCRUZ). Como controle negativo foi adicionado os reagentes e água sem adição de material genético. Os produtos amplificados foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE (TRIS/BORATO/EDTA) coradas com brometo de etídio para verificar a integridade e qualidade da amostra, visualizadas no transluminador L-PIX TOUCH.

4.2.3 Ensaio imuno histoquímico – IMQH

Para realização do ensaio, os blocos parafinados de tegumento foram cortados a 3µm de espessura, dispostos em lâminas vidro previamente limpas e sinalizadas. Inicialmente, foram executadas reações de padronização a fim de determinar as diluições, métodos de recuperação antigênica e tempo de incubação de cada anticorpo monoclonal proposto: CD68, TCD4+ e CD123+ para as seguintes populações celulares: macrófagos (subclasses M1 e M2), células T e dendríticas, respectivamente (**Tabela 2**). Como controle positivo utilizou-se a pele com lesão ativa de hanseníase e controle negativo: Pele normal.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados para ensaio imunohistoquímico em pacientes com diagnóstico de leishmaniose

Anticorpos	Clone	Espécie Alvo	Fenótipo Celular	Fabricante
TCD4 ⁺	4B 12	Human	T lymphocyte	Bio Rad
CD68	Monoclonal GTX - 39774	Hu, Rat, Rb, Goat, Bov, Cat, Dog, Gpig, Bb, ClMK,Hrs, Mink, RMK	Macrophage + Monocyte antibody	GeneTex
CD123 ⁺	C1A/711	Avian,Armenian Hamster,Baboon,B onive,Canine,Primate,Human, Mouse e etc	Mature Langerhans Cells Marker	Novus biotechnne brand

Fonte: autora (2021).

As lâminas contendo o material biológico de estudo foram submetidas às desparafinizações com Xilol I e II por dez minutos cada. Seguido da hidratação com álcool decrescente absoluto até 70%, cinco minutos cada. Para recuperação antigênica utilizou-se tampão citrato a 10 µM, pH 6, três ciclos de 3 minutos cada em microondas com potência baixa. Seguida de três lavagens de 5 minutos em PBS 0,05 M +0,2% TWEEN 20. O consumo de peroxidase endógena foi realizado por meio da incubação com H₂O₂ 5% em metanol por 45 minutos. Bloqueio de sítios inespecíficos foi executado por meio do *Serum Blocking Soluction* do kit Histostain® - SP, Broad Spectrum (HRP); incubado durante 30 min em câmara úmida. Os anticorpos monoclonais foram diluídos em 1:100 em solução tamponada de PBS, BSA 1% em câmara úmida por 14 – 16 horas (*overnight*) a 4°C. Em seguida, as foram incubadas com anticorpo secundário (kit Histostain® - SP, Broad Spectrum - HRP, Invitrogen) por 45 minutos, seguido do HRP – Streptavidin por 30 minutos, como cromógeno utilizou-se o DAB para revelação e contracoloração com hematoxilina DE Harris.

Para análise descritiva da expressão dos marcadores monoclonais, nas regiões intranuclear e intracitoplasmática utilizou-se o critério de cruzes, onde é levado em conta a intensidade da coloração e o número de células coradas. A intensidade da

coloração classifica-se em: leve, moderada e acentuada. Em relação a quantidade de células coradas, quando não há coloração, consideram-se negativo (-); quando coradas, são positivas, sendo sinalizadas por uma cruz (+) leve; duas cruzes (++) moderada e três cruzes (+++) acentuada.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para proceder a análise, os dados foram compilados em uma planilha Microsoft Excel contendo os dados obtidos a partir da análise dos prontuários, Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Ensaio Imunohistoquímico das amostras biológicas de tegumento. Foram utilizados os seguintes testes: O teste de Qui-quadrado (χ^2) para avaliar a associação entre as variáveis dependentes e independentes, teste Exato de Fisher, Binominal e o teste G. Medidas descritivas e gráficos foram obtidos para auxiliar a compreensão do comportamento das variáveis em estudo.

4.4 ASPECTOS ÉTICOS

O referido estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP / CCS / UFPE): CAAE nº: 51426415.0.0000.5208.

5ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DOS MARCADORES CD68, CD123+ E TCD4+ EM LESÕES DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Introdução

Leishmanioses são infecções parasitárias crônicas, não contagiosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* sp., transmitida a partir da picada de flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia*, naturalmente infectada (OYAMA et al., 2018; ALMEIDA; SANTOS, 2011). Integra o grupo de infecções negligenciadas, sendo uma das cinco de maior relevância para saúde pública no mundo tendo em vista sua ocorrência em países mais pobres, atingindo as populações mais vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde (OPAS/OMS, 2019). Tais infecções, podem resultar em amplo espectro de manifestações clínicas as quais são definidas a partir da interação existente entre a espécie do parasito, características do hospedeiro e a resposta imune do indivíduo infectado (ALMEIDA; SANTOS, 2011; VIANA et al., 2013; FRAGA et al., 2012).

Aproximadamente 90% dos casos na América são registrados no Brasil, Bolívia e Peru (Ministério de Saúde, 2019). Em 2019, 15.484 novos casos foram confirmados no Brasil, com coeficiente de detecção de 7,37 casos a 100 mil habitantes. No estado Pernambuco foram confirmados 329 casos, sendo que 313 corresponderam à forma clínica cutânea e 16 à forma mucosa. Dos 29 casos confirmados em Recife, 23 corresponderam à forma cutânea e 6 à mucosa (BRASIL, 2021).

As alterações histopatológicas das lesões por LT consiste em um infiltrado inflamatório de células mononucleares, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e células plasmáticas á reações granulomatosas com ou sem necrose, podendo ser encontrada hiperplasia pseudoepiteliomatosa na epiderme (VIANA et al., 2013; VIANA et al., 2012). Embora o diagnóstico, em alguns casos, possa ser feito apenas com base em critérios clínico-epidemiológicos, os testes laboratoriais são indispensáveis para o diagnóstico diferencial entre LT e demais dermatoses infecciosas (MARTINS et al., 2014).

Durante a defesa imune inata, as principais células envolvidas neste mecanismo são os neutrófilos, mastócitos, Natural Killer (NK) e monócitos. E também, as células apresentadoras de antígenos (APCs) como células dendríticas e macrófagos, célula hospedeira de caráter primário para *Leishmania* (OLIVEIRA et al., 2021; SCOTT E

NOVAIS, 2016).

Deste modo, o presente estudo visa avaliar as células envolvidas no infiltrado inflamatório - macrófagos, linfócitos T e células dendríticas nas lesões de leishmaniose tegumentar humana.

Métodos

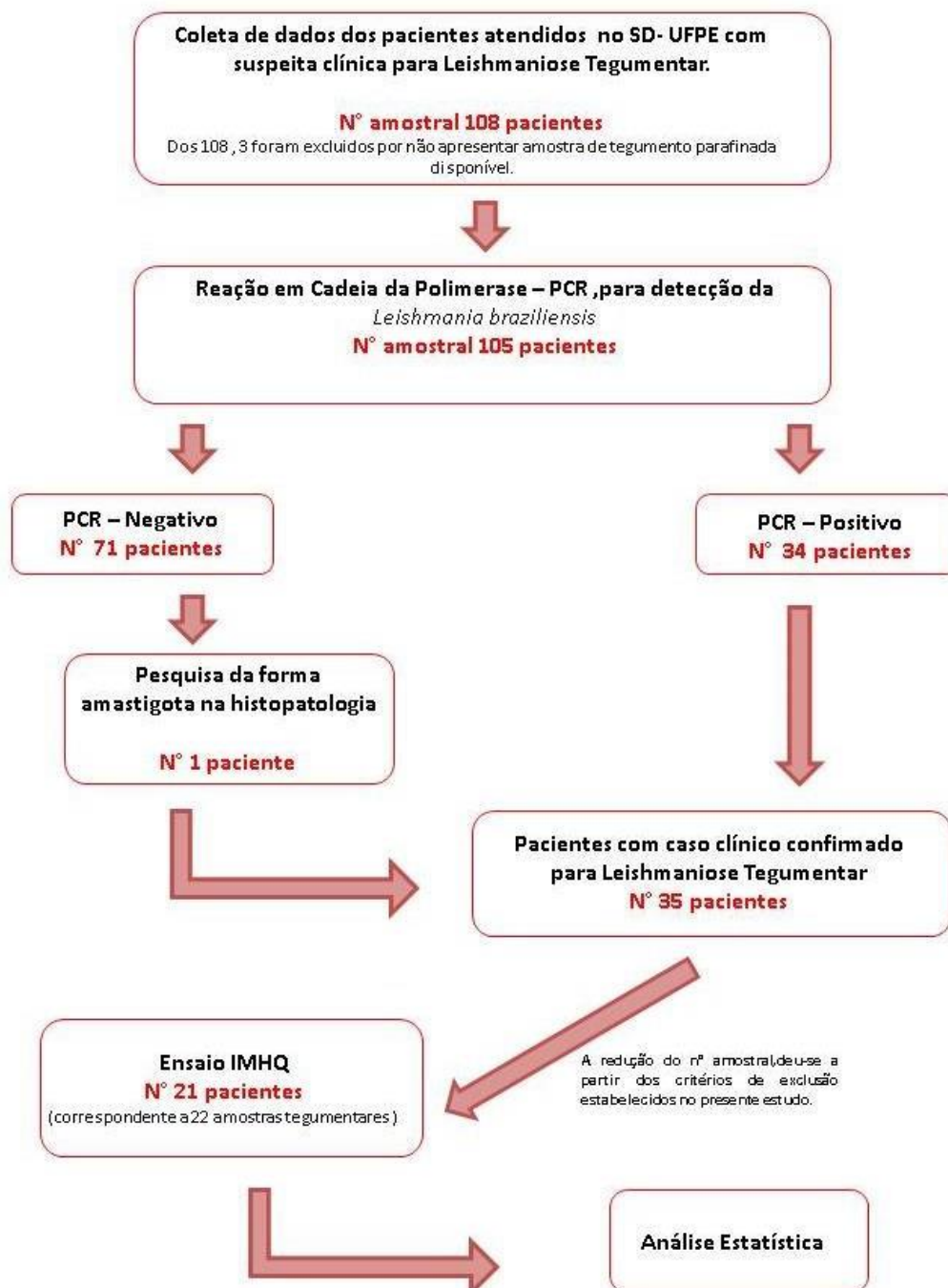
Trata-se de um estudo de retrospectivo e prospectivo, transversal do tipo observacional, envolvendo biópsias de pele de pacientes atendidos no Serviço de Dermatologia da Universidade Federal de Pernambuco (SD – UFPE), com suspeita clínica de Leishmaniose Tegumentar, a base de dados foi referente ao período de janeiro de 2016 a dezembro de 2019.

Foram analisados os perfis clínicos e laboratoriais através dos prontuários e relatórios anatomopatológicos dos pacientes que tiveram as biópsias de fragmento de tegumento coletadas no SD - UFPE, com quadro sugestivo de LT.

As amostras de biópsia de pele parafinadas previamente coletadas no serviço de Dermatologia de pacientes com suspeitas de LT foram investigadas por método molecular e histopatológicos e em seguida submetidas a realização de ensaio imunohistoquímico para investigação do sítio inflamatório com anticorpos monoclonais CD68, TCD4+ e CD123+ para marcação de macrófagos, células T CD4+ e dendríticas visualizadas no fluxograma (Figura 1).

Os pacientes que não apresentaram diagnóstico clínico e/ou anatomopatológico favorável a LT; A inexistência / insuficiência de amostras teciduais em blocos de parafina no SD - UFPE; Negatividade para o DNA de *Leishmania* no ensaio molecular por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR); Presença da forma amastigota foram excluídos do presente estudo.

Figura 1 – Fluxograma do desenho experimental e população do estudo para leishmaniose tegumentar



Fonte: autora, (2021).

Análise Estatística

Para proceder a análise, os dados foram compilados em uma planilha Microsoft Excel contendo os dados obtidos a partir da análise dos prontuários, PCR e ensaio imunohistoquímico das amostras biológicas de tegumento. Foram utilizados os seguintes testes: O teste de Qui-quadrado (χ^2) para avaliar a associação entre as variáveis dependentes e independentes, O Exato de Fisher, Binominal e o Teste G. Medidas descritivas e gráficos foram obtidos para auxiliar a compreensão do comportamento das variáveis em estudo.

Aspectos Éticos

O referido estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP / CCS / UFPE): CAAE: 51426415.0.0000.5208.

Resultados

Caracterização dos Pacientes

O perfil clínico e dados laboratoriais dos pacientes foram coletados e analisados dos prontuários médicos, contendo identificação dos pacientes, diagnóstico clínico e histopatológico. Assim como, a aquisição dos blocos de tegumento parafinados de um total de 108 pacientes atendidos fora recrutada no serviço de dermatologia da UFPE.

Foram resgatados 108 pacientes com diagnóstico sugestivo de leishmaniose tegumentar. Os dados epidemiológicos dos pacientes, foram categorizados por faixa etária, sexo e região biopsiada. A faixa etária dos pacientes do estudo variou de 5 a 90 anos. A faixa etária mais frequente dos pacientes com diagnóstico sugestivo para LT variou entre 19e59 equivale a 60,19%. A maioria dos pacientes foram o sexo masculino 50,92% (55) (**Tabela 1**).

O diagnóstico clínico deu-se a partir da análise macroscópica das biópsias cirúrgicas de tegumento, fixadas em formol a 10%, descrita nos prontuários dos pacientes que apresentam lesões características de infecção por LT.

A análise macroscópica dos fragmentos de tegumento coletado mostrou uma ampla variação morfológica correspondendo a lesões circulares, fusiformes, cilíndrica e

irregulares, com diâmetro e profundidade variáveis. O diagnóstico clínico destes pacientes, demonstraram amplo aspecto, visto que as características apresentadas nas lesões foram comumente verificadas em cromomicose, tuberculose verrucosa, esporotricose, dentre outras doenças dermatológicas.

Tabela 1 - Característica genotípica e faixa etária de pacientes com diagnóstico clínico sugestivo para leishmaniose tegumentar.

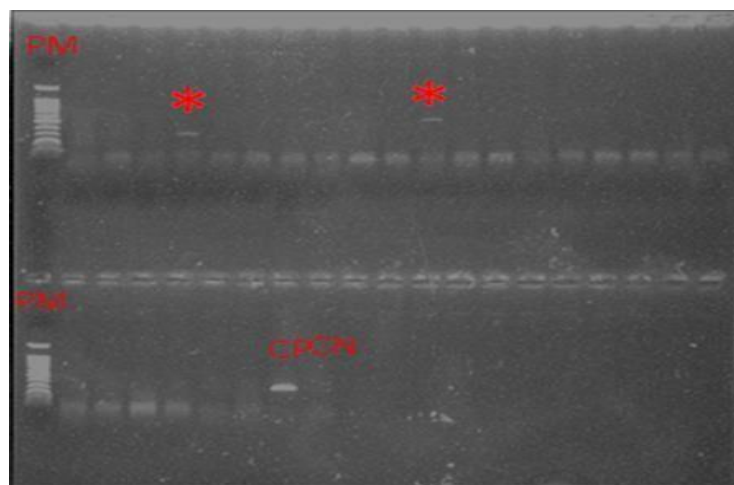
CARACTERÍSTICAS		n ° FREQUÊNCIA
IDADE	0 – 10 anos	3 (2,8 %)
	11 – 18 anos	8 (7,4%)
	19 – 59 anos	65 (60,19%)
	≥ 60	21 (19,3%)
	Não Informada	11 (10,19%)
SEXO	Feminino	52 (48,15%)
	Masculino	55 (50,92%)
	Não Informado	01(0,9%)

Fonte: autora (2021).

Biologia molecular

Do total de 108 pacientes com diagnóstico sugestivo de LT, três pacientes foram excluídos do estudo por não apresentar biópsia parafinada e/ou apresentar quantidade insuficiente para a realização do ensaio de biologia molecular para identificação das espécies de *Leishmania* através da PCR. Foram elegíveis no diagnóstico clínico e/ou anatomopatológico, assim como para o ensaio molecular 105 amostras de biópsias. Dos 105 pacientes com diagnóstico sugestivo de LT, 33,33% (35/105) tiveram diagnóstico clínico confirmado para leishmaniose tegumentar, detectando a forma amastigota. Destes 34/105 positivaram para a *Leishmania braziliensis* (**Figura 2**). E em um foi possível identificar a amastigota, forma infectante pelo método histopatológico.

Figura 2 - Identificação molecular de *Leishmania braziliensis* em amostras clínicas de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar. Utilizando ITS1-PCR, visualizada por eletroforese em gel de agarose a 1%, corada com brometo de etídio.



PM: peso molecular; * Pacientes, CP: controle positivo, CN: controle negativo.

Fonte: autora (2021).

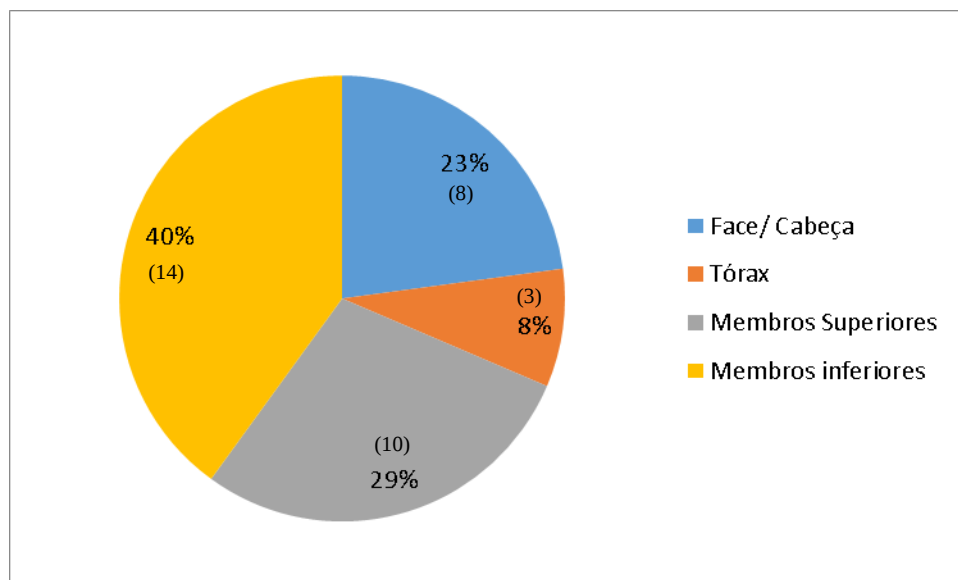
Os achados histopatológicos presentes nos pacientes positivados demonstram a presença de plasmócitos, fibrose cicatricial e áreas necrosantes, com fragmentos em suma maioria pardacentos.

Análise macroscópica e diagnóstico histopatológico

A análise macroscópica dos fragmentos de tegumento coletado mostrou uma ampla variação morfológica correspondendo a lesões circulares, fusiformes, cilíndrica e irregular, com diâmetro e profundidade variáveis. O diagnóstico clínico destes pacientes demonstrou amplo aspecto, visto que as características apresentadas nas lesões são comumente verificadas em cromomicose, tuberculose verrucosa, esporotricose, dentre outras doenças dermatológicas.

Foi analisada a região mais acometida por lesões dos 35 pacientes com diagnóstico clínico para a leishmaniose tegumentar. Estes apresentaram lesões cutâneo e/ou mucoso em distintas regiões do organismo - cabeça, tórax, membros superiores e inferiores (**Figura 3**). Pode - se verificar que a região com maior concentração de lesões correspondeu aos membros inferiores com 40% (14/35) e a que obteve menor índice de lesões foi a região torácica, correspondendo a 8% (3/35).

Figura 3 - Regiões biopsiadas dos pacientes positivos para leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis*



Fonte: autora (2021).

Das 35 amostras, 22 amostras foram analisadas pelo ensaio imunohistoquímico, 15/22 apresentaram dermatite granulomatosa; 4/22 apresentaram fibrose dérmica cicatricial; e 3/22 apresentaram úlcera crônica ativa.

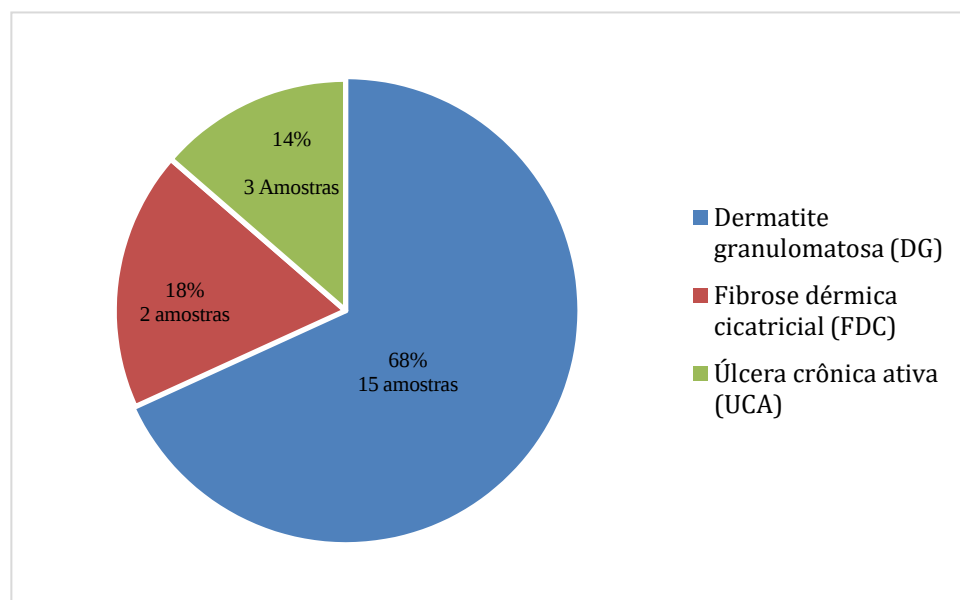
Os achados histopatológicos presentes nos pacientes confirmados a infecção por LT demonstrou a presença de plasmócitos, fibrose cicatricial e áreas necrosantes, com fragmentos em suma maioria pardacentos.

Dos 35 pacientes confirmados para a leishmaniose tegumentar pela técnica da PCR e/ou presença da forma amastigota, apenas 21 pacientes seguiram para o ensaio IMHQ. A redução deste número amostral, deu-se a partir de amostras de tegumentos insuficientes, o qual não permitiu a execução desta etapa.

Dos 21 pacientes que seguiram para o ensaio IMQH, 1/21 foi obtido duas amostras tegumentares analisadas, sendo uma da região abdominal e outra do membro superior. Totalizando desta forma 22 amostras submetidas a análise IMQH de 21 pacientes.

O material obtido foi investigado e pôde-se agrupar o diagnóstico histopatológico em: dermatite granulomatosa; fibrose dérmica cicatricial; e úlcera crônica ativa (**Figura 4**).

Figura 4 - Frequência da expressão histopatológica de 22 lesões tegumentares por *Leishmania braziliensis*



Fonte: autora (2021).

Análise do Ensaio Imunohistoquímico - IMQH

Dos 35 pacientes confirmados para LT, apenas 21 seguiram para a análise imuno-histoquímica, correspondendo a 22 amostras de tegumento. Os demais pacientes não tinham e/ou apresentaram material insuficiente para as análises.

Os dados provenientes IMQH foram compilados com base na expressão dos marcadores monoclonais TCD4⁺, CD68 e CD123⁺ para as seguintes populações celulares: macrófagos (subclasses M1 e M2), células T e dendríticas, respectivamente; nas regiões intranuclear e intracitoplasmática (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Diagnóstico clínico, relatório anatomopatológico e análise qualitativa da IMQH dos pacientes com diagnóstico confirmado para leishmaniose tegumentar, causada por *Leishmania braziliensis*

IDENTIFICAÇÃO	DIAGNÓSTICO CLÍNICO	RELATÓRIO ANATOMOPATOLÓGICO	CÉLULAS ENVOLVIDAS NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO		
			Macrófagos	Células Dendríticas	TCD4+
SD - 728	Esporotricose, Leishmaniose	Úlcera crônica ativa	++	-	-
SD - 906	Esporotricose, Leishmaniose	Dermatite granulomatosa necrosante	-	-	-
SD -33	Esporotricose, Leishmaniose	Dermatite granulomatosa	++ +	-	-
SD -197	Mh.cromomicose ,Tuberculoseverru cosa,Leishmanios e	Dermatite granulomatosa e fibrose cicatricial	++	+	-
SD - 277	Esporotricose, Leishmaniose	Dermatite granulomatosa com necrose	+++	-	-
SD -836	Leishmaniose Cutânea	Fibrose dérmica cicatricial	+	-	-

SD-970/971	Metastase cutânea, Linfoma, Sarcoidose, MH	Dermatite granulomatosa com presença de parasito intracelular	+++	+	Controle +++
SD -25234	Cronomicose, Leishmaniose, Tuberculose verrucosa	Fibrose dérmica cicatricial	+++	-	-
SD - 25403	Leishmaniose, Pioderma Gangrenosa	Úlcera crônica ativa	0	-	-
SD -25422	Leishmaniose, Dermatite Artefato, Actinomicose Vasculite	Fibrose dérmica cicatricial	0	++	++
SD -25516	Leishmaniose, Esporotricose	Dermatite granuloma com necrose	+++	-	+++
SD -25528	Leishmaniose, Carcinoma basocelular, Paracoccidiomycose	Dermatite granulomatosa	+++	-	0
SD -25558	Leishmaniose, Esporotricose	Dermatite granulomatosa	+++	0	+
SD -25665	Leishmaniose, Linfoma, Hanseníase	Dermatite granulomatosa	+++	0	-

SD -25738	Leishmaniose, Paracoccidiomico se, Sifilis, Rinospordiose	Dermatite necrose	granulomatosa	com	+++	-	+
SD -25789	Esporotricose	Dermatite necrose	granulomatosa	com	0	0	0
SD -25844	Leishmaniose, Esporotricose, Tuberculose verrucosa	Dermatite granulomatosa			-	0	0
SD -25933	Leishmaniose, Cromomicose, Lupus Vulgar	Dermatite granulomatosa			0	0	0
SD - 2	Leishmaniose, Ectine	Fibrose dérmica cicatricial			++	0	0
SD -557	Leishmaniose,Esp orotricose	Dermatite necrose	granulomatosa	com	+++	-	-
SD -607	Leishmaniose, Esporotricose, Micobacteriose Atípica,Tuberculo se Cutânea	Úlcera crônica ativa			+++	+	+++

Observação: As amostras 970 e 971, pertencem ao mesmo paciente. Foram analisadas duas amostras de tegumento (Pele do abdômen e antebraço).
Totalizando 22 amostras de pele.

Legenda: Utilizou-se o critério de cruzes, onde é levado em conta a intensidade da coloração e o número de células coradas. Quando não há coloração, marcação, considera-se negativo (-); quando coradas, são positivas, sendo sinalizadas por uma cruz (+) leve; duas cruzes (++) moderada e três cruzes (+++) acentuada. Zero (0) quando não há material.

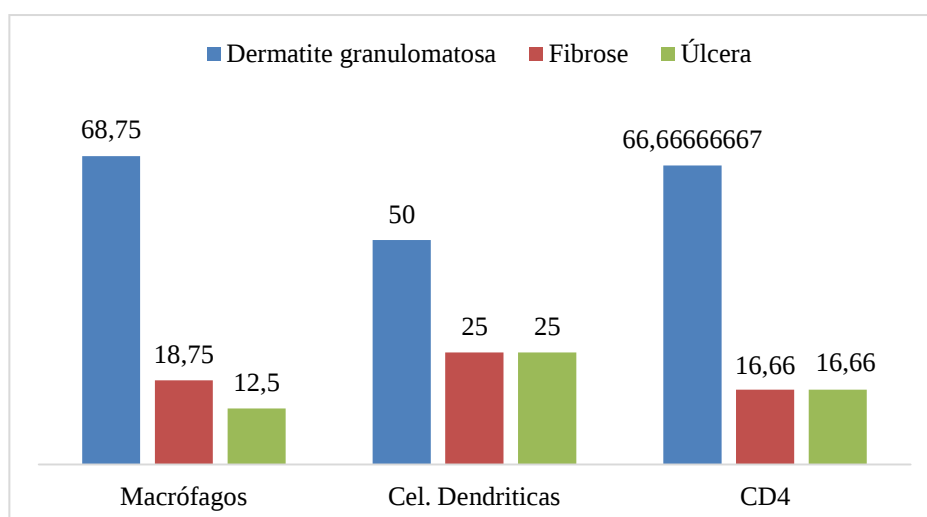
Dentre os aspectos avaliados, foi possível observar que 10/11, correspondente 91% dos casos de dermatite granulomatosa apresentaram presença de granuloma, e que apenas 1/11 (9%) das úlceras crônicas ativas apresentaram granuloma, enquanto nos casos de fibrose dérmica cicatricial não foi observado granuloma.

A presença de fibrose só foi observada nos casos de fibrose dérmica cicatricial. Dos 15 casos de dermatite granulomatosa, foi observada necrose em 6/15 (40%); a necrose só foi visualizada em 6/15 (40%) dos casos de dermatite granulomatosa. Quanto à presença visual dos parasitas, esses só foram vistos em 2/15 (13%) dos casos de dermatite granulomatosa.

De todas as células (macrófagos, células dendríticas e TCD4+) encontradas nas análises, 17/26 (65%) estavam presentes na dermatite granulomatosa, 5/26 (19%) na fibrose dérmica cicatricial, e 4/26 (15%) nas úlceras crônicas ativas. Quanto ao número de células, identificamos que as células mais observadas nas amostras foram os macrófagos, com prevalência de 16/ 26 ($\approx$ 62%), seguido por 6/16 ($\approx$ 23%) de células TCD4+, e 4/16 ($\approx$ 15%) de células dendríticas.

Ao correlacionar os achados celulares com o diagnóstico histopatológico, podemos observar que o percentual de células para cada tipo celular frente ao diagnóstico histopatológico também demonstra a predominância desses achados na dermatite granulomatosa (**Figura 5**), apesar do baixo número de células dendríticas e TCD4+ em todos os diagnósticos histopatológicos.

Figura 5 - Perfil histopatológico vs células envolvidas no infiltrado inflamatório da leishmaniose tegumentar



Fonte: autora (2021).

Ao analisar individualmente os tipos de células e o diagnóstico histopatológico, verificou que os resultados demonstram, por meio do Teste G – Independência, que não há associação estatística significativa ($p>0,05$) entre a presença de macrófagos, de células dendríticas, e de células TCD4⁺, e o diagnóstico histopatológico. Provavelmente devido ao baixo número de pacientes que apresentaram as células. Na tabela 3, pode-se observar a correlação entre as células envolvidas no infiltrado inflamatório vsdiagnóstico.

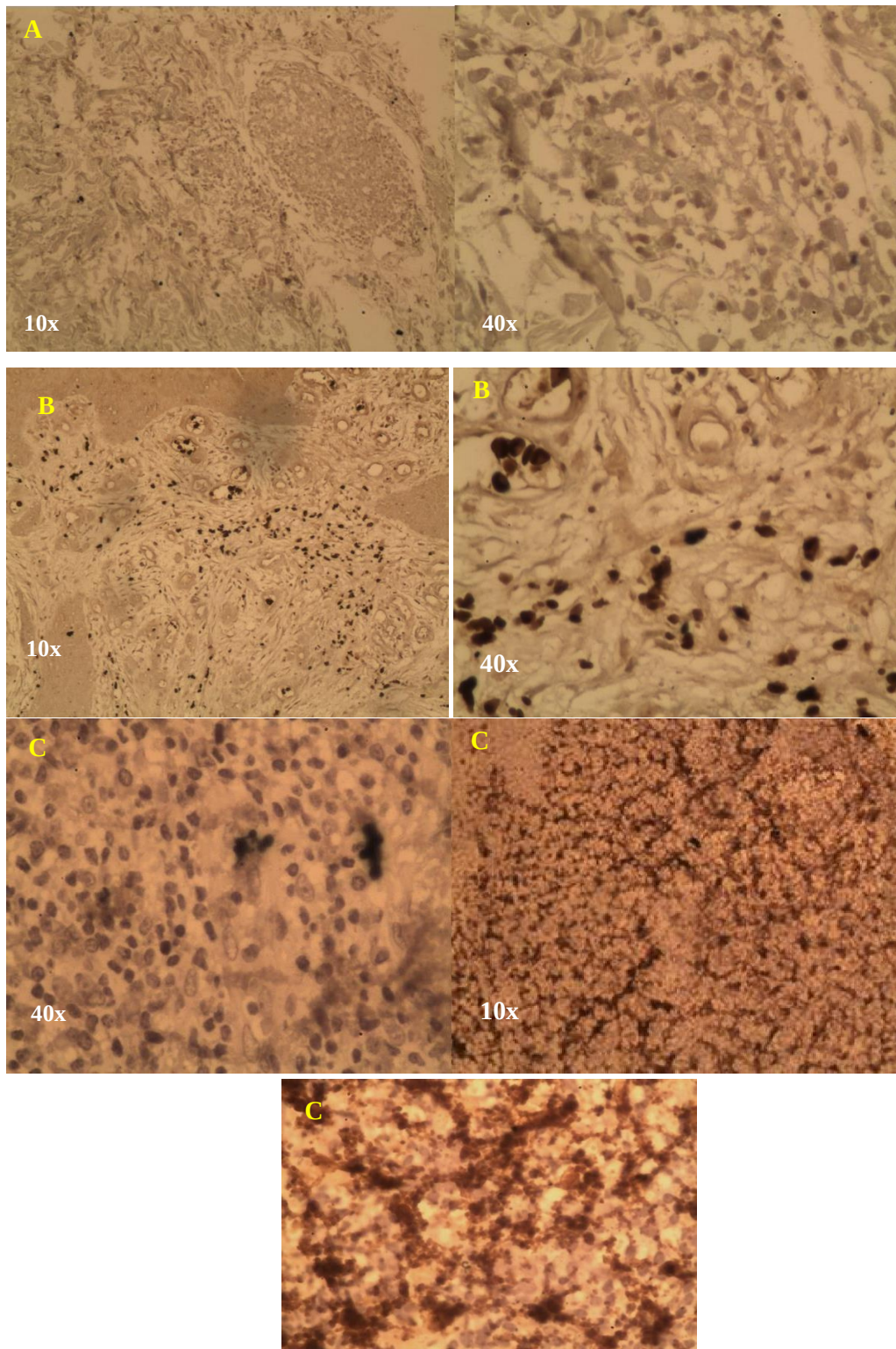
Tabela 3 - Diagnóstico histopatológico vs presença/ausência das células envolvidas no infiltrado inflamatório.

		Dermatite granulomatosa	Fibrose dérmicacatricial	Úlcera crônica ativa
Macrófagos	Presente	11	03	02
	Ausente	04	–	–
Células dendríticas	Presente	02	01	01
	Ausente	08	02	02
TCD4 ⁺	Presente	04	01	01
	Ausente	06	02	02

Fonte: autora (2021).

As fotomicrografias dos cortes histológicos (**Figura 6**) permitem-nos identificar não apenas a histopatologia da lesão apresentada pelos pacientes, mas também relacioná-las com os componentes celulares identificados de forma qualitativa.

Figura 6 -**A.** Dermatite granulomatosa com presença de parasita intracelular em paciente com leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis*. Destacando a presença de linfócitos T (TCD4⁺). **B.** Fibrose dérmica cicatricial em paciente com leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis*. Destacando a presença de células dendríticas. **C.** Dermatite granulomatosa com presença de parasita intracelular em paciente com leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis*. Destacando a presença de macrófagos. C.1. Controle. C2 e C3 células com marcação IMQ por CD68.



Fonte: autora (2021)

Discussão

LTA é caracterizada como uma doença infecto parasitária, não contagiosa, que acomete pele e mucosa (DUARTE; ROCHAEL,2006).A diversidade clínica da LC está associada à espécie do parasita e a resposta imune do hospedeiro. Mas especificamente, o equilíbrio entre os mediadores pró e anti-inflamatórios que executam papel vital na manifestação clínica e no desfecho da infecção desempenha um papel vital na apresentação clínica e no desfecho da doença (VALPEDO et al.,2021).

Os elevados índices de prevalência da leishmaniose no mundo estão atrelados principalmente à intervenção humana, como a migração, desmatamento, urbanização e imunossupressores (IHSANULLAH et al., 2021).

Os achados do presente estudo apontaram que os pacientes com suspeita clínica para leishmaniose tegumentar em sua maioria são representados pelo sexo masculino, equivalente a 50,92% dos casos. Com faixa etária acometida entre 19 e 59 anos. A predominância dos casos do sexo masculino pode estar relacionada com atividades ocupacionais em lugares de risco, como agricultura, pecuária, acampamentos e garimpo (SILVA et al., 2019; BRASIL,2021).

A dificuldade diagnóstica para a leishmaniose tegumentar, dá-se pela mesma apresentar amplo aspecto morfológico, o qual dificulta o fechamento diagnóstico do paciente, tendo em vista que inúmeros infecções dermatrópicas atinge pele e mucosa também apresentam lesões comumente associada a expressividade das apresentadas pela LTA (TIRELLI et al., 2017; SILVA et al., 2019).

Embora em determinadas áreas, a elucidação diagnóstica do quadro clínico do paciente seja possível ser realizada por intermédio, apenas, do clínico epidemiológico, faz-se necessário a comprovação por intermédio de diagnóstico laboratorial diferencial, devido ao amplo espectro das manifestações clínicas. Comumente confundidos com outras infecções dermatrópicas (MURBACK et al., 2011).

Do número amostral de 108 pacientes, apenas 35 deles foi possível confirmar o diagnóstico clínico. Os demais podem estar atrelados a outras infecções.

A técnica de biologia molecular, PCR, tem sido uma aliada no diagnóstico da LTA, devido alta sensibilidade e especificidade, permitindo a identificação e

caracterização genômica da espécie causadora das leishmanioses (GÁRCIA et al.,2005).

A *Leishmania braziliensis* é considerada o agente etiológico de maior prevalência, com ampla distribuição geográfica desde a América Central ao Norte da Argentina. Sendo facilmente localizada em todas as regiões do Brasil. A expressividade da ecoepidemiológica e o modo de transmissão estão relacionados com a particularidade da região (BRASIL, 2017; ANDRADE et al.,2005). A presença da *Leishmania braziliensis* foi detectado em 33% pacientes investigados, podendo ser caracterizado devido a ampla distribuição deste agente no Brasil.

A resposta imune desencadeada pela *Leishmania* inicia-se com a resposta inata, no qual os receptores TLR2 (Toll-like receptor 2) existentes nos macrófagos, células NK (Natural Killer) e células dendríticas fazem o reconhecimento das moléculas presentes na superfície dos parasitas. A ativação dos macrófagos por intermédio do Th1, culmina na síntese de óxido nítrico que em comunhão com o stress oxidativo representa mecanismo importante na eliminação do parasito. As citocinas Th2 contribuem para a multiplicação do parasito. Evidências apontam que as células T CD8 são importantes no controle das leishmanioses por meio da síntese de citocina e mecanismos citotóxicos. (VASCONCELOS et al., 2018).

A resistência à leishmaniose está intimamente relacionada com o desenvolvimento da Th1 e a produção de citocinas pró – inflamatória – IL 12, IL 1, IFN - γ , TNF α que leva a ativação dos macrófagos e morte do parasita. A suscetibilidade está associada ao desenvolvimento e produção de citocinas Th2, como IL 4, IL 3 e/ou IL 13, que culmina na replicação e persistência do parasita (MASPI et al.,2016).

Entretanto ainda há vários paradoxos a respeito do papel exercido pelas respostas imunes na imunopatologia e imunoproteção contra as LC. Embora saiba-se que a resposta Th1 e a síntese de citocinas pró- inflamatória exerçam papéis centrais na imunoproteção, a produção exacerbada pode concomitantemente induzir a imunopatologia grave da doença. A baixa produção de citocinas anti-inflamatórias diminui as reações inflamatórias e acelera a cicatrização das lesões (MASPI et al.,2016).

O controle das infecções causadas por leishmanioses, dá-se por intermédio de uma cascata de sinalização complexa, onde faz-se presente os neutrófilos, mastócitos, NK, monócitos e as células apresentadoras de antígenos – dendríticas e macrófagos,

principais células envolvidas na defesa da resposta imune inata. Além dos linfócitos TCD4+, Th1 e Th2 da resposta imune adaptativa. Vale salientar que a depender da espécie causadora, o sistema imune pode atuar de distintas maneiras (OLIVEIRA et al.,2021).

A resposta imune da leishmaniose humana e experimental é caracterizada pela mediação e predominância dos linfócitos T. Essas células são essenciais na resposta frente ao hospedeiro, sendo crucial para a cura e também resposta imune protetora, concomitantemente também são responsáveis pela sua patologia e persistência da doença. A resposta linfocitária na leishmaniose tegumentar americana caracteriza-se pelo crescente número de células T CD4+ (CASTRO, 2013).

Os TCD4+ são células fundamentais no controle da *Leishmania*, tais células após a infecção são responsáveis para sintetizar IFN γ e ativar os macrófagos nas lesões. Estudos revelam que elas, TCD4+, não exercem interação com todas as células infectadas nem são verificadas distribuídas de forma uniforme (SCOTT e NOVAIS, 2016). Isso pode ter sido fator determinante para a identificação do baixo número destas células, neste presente estudo. O qual correspondeu apenas a 23% (6/16) das células identificadas.

As células dendríticas tem papel fundamental nos ensaios imunológicos, são responsáveis por promover e suprimir a resposta imune dependente dos linfócitos T (MELLOR e MUNN, 2004). Possui as moléculas co-estimulatórias que são necessárias para indução das células T -naive (COSTA; MAFRA; BRITO, 2021). As DCs são as células apresentadoras de antígenos mais eficientes na ativação dos linfócitos T. Estão distribuídas em praticamente todos os tecidos periféricos, bem como em órgãos linfoides primários e secundários. As células são originadas a partir de precursores mieloide (Expressam CD11) e linfoides, CD123+ (JARAMILLO, 2014). O presente estudo revela uma baixa predominância dessas células, em todos os diagnósticos histopatológicos.

Estudos apontam que após a infecção por *L. major*, as células de langerhans (CLs), linhagens de células dendríticas na pele, são capazes de fagocitar, migrar para os linfonodos e exercer papel como célula apresentadora. Outros estudos apontam que na infecção experimental por *Leishmania*, CDd, e não CLs, são responsáveis por uma resposta imune protetora na infecção intracelular de *L. major* (COSTA; MAFRA; BRITO, 2022).

Os macrófagos foram as células com maior incidência no presente estudo, apresentando-se em todos os diagnósticos histopatológicos - dermatite

granulomatosa, fibrose dérmica cicatricial e úlcera crônica ativa. São células importantíssima por ser o principal reservatórios para a *Leishmania*, além de desempenhar a fagocitose dos parasitas em sítio de lesão. Exerce papel de defesa frente ao hospedeiro, assim como desempenha papel na promoção e regulação da resposta imunológica. Quando ativos, dispõem de mecanismos microbicida que apresenta capacidade de eliminar o parasita. Apresentam plasticidade, pode exercer fenótipos diferentes em resposta aos distintos estímulos do microambiente (PEREIRA, 2018; SILVA, 2015).

Conclusões

O amplo espectro morfológico das lesões por *Leishmania*, dificulta o diagnóstico final leishmaniose tegumentar. Tendo em vista que tal infecção apresentam lesões comuns à outras doenças dermatóticas. A *Leishmania braziliensis* é a espécie mais frequente no estado de Pernambuco, com ocorrência de 33,33% dos casos clínicos avaliados. Ao analisar individualmente os tipos de células e o diagnóstico histopatológico, verificamos que os resultados demonstraram, por meio do Teste G – Independência, que não houve associação estatística significativa ($p > 0,05$) entre a presença de macrófagos, de células dendríticas e de células T CD4+ e o diagnóstico histopatológico.

Limitação do estudo

O número amostral baixo também foi determinante para os dados de significância obtidos. A falta de informação quanto ao tempo de evolução das lesões e as perdas das amostras parafinadas no estudo podem ter corroborado para a baixa significância dos testes aplicados.

Conflito de interesse

Os autores declaram nenhum tipo de conflito de interesse.

Contribuições dos autores

KMLB Desenvolveu concepção e desenho experimental, **CRPS** analisou os dados. **KMLB** realizaram experimentos e interpretaram dados, **FLM** e **SG** forneceram

insumos par a realização dos ensaios. **FJSRe JPM**conceberam e projetaram pesquisas. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães –IAM FIOCRUZ pela realização dos testes moleculares. E a Universidade Federal de Pernambuco –UFRPE pelo material da análise de imunohistoquímica.

Referências

OYAMA, J . et al. American tegumentary leishmaniasis: diagnostic and treatment challenges in a clinical case. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 60, 15 fev. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201860003>.

ALMEIDA OLS, SANTOS JB. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. An Bras Dermatol. 86(3):497-506, 2011.

Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2019 Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis

VIANA, A.G. et al. Histopathological and immunohistochemical aspects of American cutaneous leishmaniasis before and after different treatments*. Anais Brasileiros de Dermatologia, [s.l.], v. 88, n. 1, p.32-40, fev. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962013000100003>.

FRAGA, C.A.C. et al. Immunohistochemical profile of HIF-1 α , VEGF-A, VEGFR2 and MMP9 proteins in tegumentary leishmaniasis. Anais Brasileiros de Dermatologia, [s.l.], v. 87, n. 5, p.709-713, 2012.

Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net , 2021.

VIANA, A.G; FRAGA, C.A.C; BONAN, P.R.F. Evaluation of myofibroblasts and its association with TGF- β and IFN- γ in lesions of patients with american tegumentary leishmaniasis. Anais Brasileiros de Dermatologia, [s.l.], v. 87, n. 4, p.545-549, ago. 2012.<https://doi.org/10.1590/S0365-05962012000400004>

MARTINS, A.L.G.P. et al. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. Anais Brasileiros de Dermatologia, [s.l.], v. 89, n. 1, p. 52-58, jan. 2014.

Oliveira D.K.F et al .Immunological Aspects of Dermotropic and viscerotropic leishmaniasis. Unimontes Científica, Montes Claros (MG),Brasil, v. 23, n. 2, p. 1-14, jul./dez. 2021. <https://doi.org/10.46551/ruc.v23n2a03>

SCOTT, P; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. Nat Rev Immunol, v.16, n.9, p.581-92, 2016

VALPEDO, G. et al. Mecanismos de Imunopatogenia na Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (PKDL). Microbiol de Infecção de Célula Frontal. V 11; 2021

IHSANULLAH. et al. Prevalence of cutaneous leishmaniasis in the largest populated city Karachi, Pakistan. Braz. J. Biol. 83.2021.
<https://doi.org/10.1590/1519-6984.247583>

BRASIL, Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net , 2021

TIRELLI, F; VERNAL, S; ROSELINO A.M. Final diagnosis of 86 cases included in differential diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a Brazilian sample: a retrospective cross- sectional study. An. Bras.Dermatol. 2017;92(5):642-648.
<http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20175794>

MURBACK,N.D.N et al. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no hospital Universitário De Campo Grande, Mato Grosso Do Sul, Brasil. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 86, n. 1, p. 55-63, fev. 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962011000100007>.

GÁRCIA FCB. et al. Subsidiary methods for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis (ATL): comparison of sequencing of DNA and PCR-RFLP for identification of leishmania species in skin samples.Investigação Clínica, Epidemiológica, Laboratorial e Terapêutica • An. Bras. Dermatol. 80 (suppl 3) ,Dez 2005 .
<https://doi.org/10.1590/S0365-05962005001000013>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p.: il.

ANDRADE, M.S. et al . American tegumentary leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis in military training area of Zona da Mata in Pernambuco. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38 (3) Maio 2005.
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822005000300004>

VASCONCELOS, J.MG. et al. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. RBAC. 2018;50(3):221-7. DOI: 10.21877/2448-3877.201800722

MASPI, N; ABDOLI, A; GHAFARIFAR, F. Pro-and antiinflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health*, v.110, n. 6, p.247-260, Sep 2016.

DOI: [10.1080/20477724.2016.1232042](https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1232042)

CASTRO,M.A.C.B.Estudo do papel de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e suas citocinas na Leishmaniose Tegumentar Americana. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas . Recife, p 132.2013.

https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/13212/1/Doutorado%20Carolina_Tese_Final_P%3%b3s_banca.pdf

COSTA L.W ; MAFRA E.V ; BRITO M.W . Papel das células dendríticas na imunopatogenia da Leishmaniose tegumentar Americana – um referencial teórico . *Alergia e Imunologia abordagens clínicas e prevenções*, Cap 5 , 2021.
Doi : 10.37885/210504602

JARAMILLO, Tatiana María Giraldo. Caracterização celular e imunológica da interação células dendríticas- *Leishmania braziliensis*. 2014. 127 f., il. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

PEREIRA, N.V. Macrófagos polarizados M2 na resposta tecidual das lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar americana. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de São Paulo. p.96.2018.

<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5133/tde03072018>

SILVA,M.L.F. Análise de macrófagos M1 e M2 em modelo experimental de leishmaniose cutânea submetido à terapia fotodinâmica associada ao ácido 5-aminolevulínico . Dissertação (Mestrado - Ciências Fisiológicas)- Universidade Federal do Triângulo Mineiro. P48.2015.

6 CONCLUSÕES

- O amplo espectro morfológico das lesões por *Leishmania*, dificulta o diagnóstico final leishmaniose tegumentar. Tendo em vista que tal infecção apresentam lesões comuns à outras doenças dermatótropas;
- A realização do diagnóstico molecular é de suma importância para a conclusão do diagnóstico final da leishmaniose tegumentar;
- A *Leishmania braziliensis* é a espécie mais frequente no estado de Pernambuco, sendo detectada em 33,33 % dos casos clínicos avaliados neste estudo;
- Ao analisar individualmente os tipos de células e o diagnóstico histopatológico, verificamos que os resultados demonstraram, por meio do Teste G – Independência, que não houve associação estatística significativa ($p > 0,05$) entre a presença de macrófagos, de células dendríticas e de células T TCD4+ e o diagnóstico histopatológico;
- A falta de informação quanto ao tempo de evolução das lesões e as perdas das amostras parafinadas no estudo podem ter corroborado para a baixa significância dos testes aplicados;
- O número amostral baixo também foi determinante para os dados de significância obtidos.

REFERÊNCIAS

- ABRAÃO, L.S.O. et al. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana no estado do Pará, Brasil, entre 2008 e 2017. *Rev Pan Amaz Saude* . 2020, vol.11, e202000612. Epub 18-Nov-2020. ISSN 2176-6215.
<http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223202000612.11:e202000612>
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* 10(3): e0004349, 2016.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- ALMEIDA OLS, SANTOS JB. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *An Bras Dermatol*. 86(3):497-506, 2011.
- ANDRADE, M.S. et al . American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in military training area of Zona da Mata in Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 38 (3) Maio 2005.
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822005000300004>
- CASTRO,M.A.C.B.Estudo do papel de linfócitos T CD4+ e CD8+ e suas citocinas na Leishmaniose Tegumentar Americana. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas . Recife, p 132.2013.
https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/13212/1/Doutorado%20Carolina_Tese_Final_P%3%b3s_banca.pdf
- SOUZA-ATTA ,M.L.B et al .Immunoglobulin E Antileishmanial Antibody Response in Cutaneous Leishmaniasis. *Journal List .Clin Diagn Lab Immunol*.9(1); 2002 Jan. PMC119873. doi: 10.1128/CDLI.9.1.101-104.2002
- BASANO S.A , CAMARGO L.M.A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control .*Rev. bras. epidemiol*. 7 (3), set 2004.
<https://doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300010>
- BOUSSOFFARA, T. et al. Células T citotóxicas ativadas em lesões zoonóticas de leishmaniose cutânea. *Immun Inflamm Dis* . 2019; 7 (3): 95-104.
doi: 10.1002 / iid3.240
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p.: il.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F., MORGADO, F.N., and COUTINHO, S.G. A Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.,

and ALVES, C. R., comps. Leishmanioses do continente americano [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, pp. 357-379. ISBN 978-85- 7541-568-9.
<https://doi.org/10.7476/9788575415689.0021>.

COSTA L.W ; MAFRA E.V ; BRITO M.W . Papel das células dendríticas na imunopatogenia da Leishmaniose tegumentar Americana – um referencial teórico . Alergia e Imunologia abordagens clínicas e prevenções, Cap 5 , 2021.
 Doi : 10.37885/210504602

FRAGA, C.A.C. et al. Immunohistochemical profile of HIF-1 α , VEGF-A, VEGFR2 and MMP9 proteins in tegumentary leishmaniasis. Anais Brasileiros de Dermatologia, [s.l.], v. 87, n. 5, p.709-713,2012.

GÁRCIA FCB. et al. Subsidiary methods for the diagnosis of American tegumentar leishmaniasis (ATL): comparison of sequencing of DNA and PCR-RFLP for identification of leishmania species in skin samples. Investigação Clínica, Epidemiológica, Laboratorial e Terapêutica • An. Bras. Dermatol. 80 (suppl 3) ,Dez 2005 .
<https://doi.org/10.1590/S0365-05962005001000013>

GONTIJO, B ; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, [s.l.], v. 36, n. 1, p.71-80, jan. 2003.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822003000100011>.

GONZÁLEZ, K. et al. Histopathological characteristics of cutaneous lesions caused by Leishmania Viannia panamensis in Panama.. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 60 , 2018 .
<https://doi.org/10.1590/S1678-9946201860008>

GUERRA, J.A.O. et al. Mucosal Leishmaniasis Caused by Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Viannia) guyanensis in the Brazilian Amazon. PLoS Neglec trop diseases. 2011; 5 (3): 980.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000980>

IHSANULLAH. et al. Prevalence of cutaneous leishmaniasis in the largest populated city Karachi, Pakistan. Braz. J. Biol. 83.2021.
<https://doi.org/10.1590/1519-6984.247583>

JARAMILLO, Tatiana María Giraldo. Caracterização celular e imunológica da interação células dendríticas- Leishmania braziliensis. 2014. 127 f., il. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

JOSÉ, F.F. et al. Evaluation of the ability of Montenegro skin test to induce specific immune response.Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 537-542, dez. 2001.
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822001000600007>

LESSA, M.M. et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. Rev. Bras. Otorrinolaringol. 73 (6) Dez 2007.
<https://doi.org/10.1590/S0034-72992007000600016>

MAGALHÃES, A.V. et al. Histopathology of mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*: 1. Histological patterns and evolutive study of the lesions. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 253-262, ago. 1986.
<https://doi.org/10.1590/S0036-46651986000400008>

MARTINS, A.L.G.P. et al. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. Anais Brasileiros de Dermatologia, [s.l.], v. 89, n. 1, p. 52-58, jan. 2014.
<https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142226>

MARZOCHI, M. C. A; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control . Cad. Saúde Pública 10 (suppl 2) • July 1994 • <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1994000800014>

MASPI, N; ABDOLI, A; GHAFARIFAR, F. Pro-and antiinflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. Pathog Glob Health, v.110, n. 6, p.247-260, Sep 2016.
 DOI: [10.1080/20477724.2016.1232042](https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1232042)

MEIDE, W.F . et al. Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Assay as a New Molecular Tool for Detection and Quantification of *Leishmania* Parasites in Skin Biopsy Samples. Journal Of Clinical Microbiology, v. 43, n. 11, p. 5560-5566, nov. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.43.11.5560-5566.2005>.

MELLOR, A. L., MUNN, D. H. Expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nature reviews. Immunology, 4(10), 762–774 ; 2004.
<https://doi.org/10.1038/nri1457>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. Boletim Epidemiologia. Rio de Janeiro , 50 (nº .especial), p. 1-154, Setembro 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

BRASIL. Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net , 2019.

BRASIL.Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net , 2021.

MOTA, L.A.A ; MIRANDA, R.R Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia , v. 15, n. 3, p. 376-381, set. 2011.

<https://doi.org/10.1590/S1809-48722011000300017>

MURBACK, N.D.N et al. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no hospital Universitário De Campo Grande, Mato Grosso Do Sul, Brasil. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 86, n. 1, p. 55-63, fev. 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962011000100007>.

Neves, DP. Parasitologia Humana, 13ª ed, São Paulo, Atheneu, 2016.

Oliveira D.K.F et al .Immunological Aspects of Dermotropic and viscerotropic leishmaniasis. Unimontes Científica, Montes Claros (MG), Brasil, v. 23, n. 2, p. 1-14, jul./dez. 2021. <https://doi.org/10.46551/ruc.v23n2a03>

Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2019 Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis

OYAMA, J . et al. American tegumentary leishmaniasis: diagnostic and treatment challenges in a clinical case. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 60, 15 fev. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201860003>.

PEREIRA, N.V. Macrófagos polarizados M2 na resposta tecidual das lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar americana. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de São Paulo. p.96.2018.

<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5133/tde03072018>

REIS, L.C et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. Revista De Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology. Goiânia. v. 35, n. 2, p. 103–116, 2007 <https://doi.org/10.5216/rpt.v35i2.1899>

ROCHA, F.J.S et al. Expression on hypoxia inducible factor-1 α in human tegumentary leishmaniosis caused by Leishmania braziliensis. An. Parasitol. 2018;64(1):73-76. doi: 10.17420/ap6401.136

SAMPAIO, R.N.R et al. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV/AIDS: report of four clinical cases. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 35, n.6, p.651-654, dez. 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822002000600017>.

SANTIAGO ,A.S ; PITA , S.S.R ; GUIMARÃES ,E.T. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review . Research, Society and Development, v. 10, n. 7, e29510716543, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16543>.

SCOTT, P; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*, v.16, n.9, p.581-92, 2016

SILVA, M.L.F. Análise de macrófagos M1 e M2 em modelo experimental de leishmaniose cutânea submetido à terapia fotodinâmica associada ao ácido 5-aminolevulínico . Dissertação (Mestrado - Ciências Fisiológicas)- Universidade Federal do Triângulo Mineiro. P48.2015.

TELES, G.C ; FONSECA, F.R ; GONÇALVES, M.J.F. American tegumentary leishmaniasis in the Brazilian Amazon from 2010 to 2014. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 61, 2019. DOI: 10.1590/S1678-9946201961022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30970050/>.

TIRELLI, F; VERNAL, S; ROSELINO A.M. Final diagnosis of 86 cases included in differential diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a Brazilian sample: a retrospective cross- sectional study. *An. Bras.Dermatol.* 2017;92(5):642-648. <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20175794>

VASCONCELOS, J.MG. et al. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. *RBAC.* 2018;50(3):221-7. DOI: 10.21877/2448-3877.201800722

VIANA, A.G. et al. Histopathological and immunohistochemical aspects of American cutaneous leishmaniasis before and after different treatments*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, [s.l.], v. 88, n. 1, p.32-40, fev. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962013000100003>.

VIANA, A.G; FRAGA, C.A.C; BONAN, P.R.F. Evaluation of myofibroblasts and its association with TGF- β and IFN- γ in lesions of patients with american tegumentary leishmaniasis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, [s.l.], v. 87, n. 4, p.545-549, ago. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962012000400004>

VALPEDO, G. et al. Mecanismos de Imunopatogenia na Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (PKDL). *Microbiol de Infecção de Célula Frontal.* V 11; 2021

ANEXO A - Certificado de aprovação da CEUA / UFPE

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
---	---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Aspectos do vetor, do parasito e da resposta do hospedeiro nas leishmanioses no estado de Pernambuco

Pesquisador: Francisca Janaina Soares Rocha

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51426415.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.400.454

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 02 de Fevereiro de 2016

Assinado por:

LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS	
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-800
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588	E-mail: cepocs@ufpe.br