

MARCO AURÉLIO DA SILVA PEIXOTO

**FORMA MUCOSA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA:
ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DE CASOS
DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, na sala de reuniões da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, com área de concentração em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães

**BRASÍLIA – DF
2009**

***“Somehow I know that there's a place up above with no more hurt and
struggling, free of all atrocities and suffering.
Because I feel the unconditional love from one who cares enough for me
to erase all my burdens and let me be free to...
Fly like a bird, take to the sky! I need you now Lord carry me high.
Don't let the world break me tonight I need the strength of you by my side.
Sometimes this life can be so cold,
I pray you'll come and carry me home”***

MC – TEOM: “Fly like a bird”

***“On and on, on the beat goes...
On and on, on the beat goes...
On and on, on the beat goes...”
M.***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. ALBINO VERÇOSA DE MAGALHÃES pela oportunidade em minha vida, paciência e confiança.

À Profa. Dra. FABIANA PIRANI pelo apoio e estímulo ao desenvolvimento desse projeto.

Aos MEUS PAIS por entenderem a distância do convívio familiar.

Ao Sr. FABRÍCIO SPINDOLA ARAÚJO pelo carinho e amizade.

À Prof. Dra. JACIRA AZEVEDO CORTES por mostrar um caminho a seguir.

À Prof. Dra. IVÂNIA PIMENTA GOUVEA por ser um dos primeiros exemplos de como excelente profissional ser.

Aos MEUS MESTRES PATOLOGISTAS do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná que me ensinaram muito dessa ciência investigativa e incessante: a Patologia.

Aos MEUS AMIGOS Dr. EDUARDO CILIAO MUNHOZ e Dr. MARCUS VINICUS LIMA por me apoiarem sempre... Principalmente no fim dessa jornada.

A DEUS por querer que eu tenha força de levantar a cada dia, dar um passo e começar uma nova caminhada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	01
2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA.....	05
2.1.1 Formas mucosas.....	05
2.2. <i>Leishmania</i> : ANTÍGENOS SECRETADOS E NÃO SECRETADOS.....	06
2.3 IMUNOPATOLOGIA.....	07
2.3.1 Resposta imune inata.....	09
2.3.2 Resposta imune adquirida: ação das células T.....	12
2.4 HISTOPATOLOGIA E OS PADRÕES DE REAÇÃO.....	14
2.5 APTOSE E LEISHMANIOSE.....	16
3 IMUNO-HISTOQUÍMICA	18
4 JUSTIFICATIVA	20
5 OBJETIVOS	21
5.1 OBJETIVOS GERAIS.....	21
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
6 MATERIAL E MÉTODOS	22
6.1 DEFINIÇÃO DE AMOSTRA.....	22
6.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	23
6.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	23
6.4 MATERIAIS.....	23
6.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	24
6.6 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	24
6.6.1 Técnica das reações.....	25
6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28

7 RESULTADOS	29
7.1 RESULTADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS.....	29
7.2 RESULTADOS DOS EXAMES COMPLEMENTARES.....	32
7.3 RESULTADOS DO ESTUDO HISTOPATOLÓGICO.....	33
7.4 RESULTADOS DO ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	45
8 DISCUSSÃO	57
9 CONCLUSÃO	65
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
11 ANEXOS	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 -	PICADA DO FLEBOTOMÍNEO ALCANÇANDO VASOS DA DERME SUPERFICIAL (À ESQUERDA) E FORMAÇÃO DO “LAGO” HEMÁTICO COM FORMAS PROMASTIGOTAS (À DIREITA DO PROBÓSCIDO) (ALMEIDA et al., 2003).....	03
FIGURA 02 -	AÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO LOGO APÓS A INOCULAÇÃO DOS PARASITAS NA DERME (STEBUT, 2007).....	08
FIGURA 03 -	FAGOCITOSE DA FORMA PROMASTIGOTA E FORMAÇÃO DA FORMA AMASTIGOTA (HANDMAN & BULLEN, 2002).....	10
FIGURA 04 -	RESPOSTA IMUNE ADQUIRIDA NA LEISHMANIOSE (AWASTHI et al., 2004).....	12
FIGURA 05 -	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO DA LTA. BIÓPSIAS (A E B) E ESFREGAÇOS (C E D): MACRÓFAGOS CONTENDO <i>LEISHMANIA</i> NO CITOPLASMA (MURRAY et al., 2005).....	15
FIGURA 06 -	DISTRIBUIÇÃO DE CASOS EM RELAÇÃO À REGIÃO DE NATURALIDADE (A) E PROCEDÊNCIA (B) DOS PACIENTES.....	30
FIGURA 07 -	FOTOMICROGRAFIAS DE ALTERAÇÕES EPITELIAIS HIPERPLÁSICA E INFLAMATÓRIA.....	35
FIGURA 08 -	FOTOMICROGRAFIAS DE ALTERAÇÕES EPITELIAIS HIPERPLÁSICAS.....	36
FIGURA 09 -	FOTOMICROGRAFIAS DE ALTERAÇÕES EPITELIAIS INFLAMATÓRIA E HIPERPLÁSICA.....	37
FIGURA 10 -	FOTOMICROGRAFIAS DE ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO CELULAR NO CÓRION.....	39
FIGURA 11 -	FOTOMICROGRAFIAS DE ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO CELULAR NO CÓRION COM PRESENÇA DE GRANULOMAS.....	40

FIGURA 12 -	FOTOMICROGRAFIAS DE ALTERAÇÕES TISSULARES INFLAMATÓRIAS/ADAPTATIVAS.....	41
FIGURA 13 -	FOTOMICROGRAFIA: DA DEMONSTRAÇÃO DA <i>Leishmania</i> (SETA).....	44
FIGURA 14 -	FOTOMICROGRAFIAS DE REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS PARA O CD45RO.....	51
FIGURA 15 -	FOTOMICROGRAFIAS DE REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS PARA O CD20.....	52
FIGURA 16 -	FOTOMICROGRAFIAS DE REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS PARA O CD8.....	53
FIGURA 17 -	FOTOMICROGRAFIAS DE REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS PARA O CD15.....	54
FIGURA 18 -	FOTOMICROGRAFIAS DE REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS PARA O CD68.....	55
FIGURA 19 -	FOTOMICROGRAFIAS DE REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS PARA O BCL-2.....	56
FIGURA 20 -	UTILIZANDO O CAPTURADOR DE IMAGEM E O PROGRAMA WINTV2000K VERSÃO 4.7.23045 (1998-2004).....	73
FIGURA 21 -	UTILIZANDO O PROGRAMA UNBVISION.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO AO SEXO.....	30
GRÁFICO 02 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO ÀS PROFISSÕES DOS PACIENTES.....	30
GRÁFICO 03 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO AO LOCAL DAS LESÕES (A) E AOS SINAIS E SINTOMAS (B) DOS PACIENTES.....	31
GRÁFICO 04 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO AO TIPO DE LESÃO AO EXAME OTORRINOLARINGOLÓGICO.....	31
GRÁFICO 05 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO À FORMA CLÍNICA DOS CASOS.....	31
GRÁFICO 06 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO ÀS COMORBIDADES DOS CASOS.....	32
GRÁFICO 07 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO AO RESULTADO DA PRIMEIRA IFA (IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA).....	33
GRÁFICO 08 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO AO LOCAL DE OBTENÇÃO DAS BIÓPSIAS.....	34
GRÁFICO 09 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO ÀS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EPITELIAIS DOS CASOS.....	34
GRÁFICO 10 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO ÀS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO CELULAR NO CÓRION.....	38
GRÁFICO 11 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO ÀS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS/ADAPTATIVAS TISSULARES NO CÓRION.....	42
GRÁFICO 12 -	RESULTADO DA PESQUISA DE <i>LEISHMANIA</i> POR MÉTODOS PARASITOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICO (A) E SOMENTE PELA HISTOPATOLOGIA DO ESTUDO (B).....	42

GRÁFICO 13 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO À QUANTIDADE DE PARASITAS (A) E AOS MÉTODOS EM QUE ELES FORAM OBSERVADOS (B).....	43
GRÁFICO 14 -	FREQÜÊNCIA DA PRESENÇA DE <i>LEISHMANIA</i> EM MÉTODOS HISTOLÓGICO/PARASITOLÓGICOS EM RELAÇÃO AO CONTATO PRÉVIO COM ANTIMONIAL PENTÁVALENTE.....	43
GRÁFICO 15 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO À CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS CASOS (A) E A OCORRÊNCIAS NAS FORMAS CLÍNICAS (B).....	45
GRÁFICO 16 -	DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DA MÉDIA DO NÚMERO DE CÉLULAS/MM ² POR CLASSE HISTOPATOLÓGICA EM RELAÇÃO AOS MARCADORES DA IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA LINFÓCITOS T (CD45RO), LINFÓCITOS B (CD20), MACRÓFAGOS (CD68) E NEUTRÓFILOS (CD15).....	47
GRÁFICO 17 -	DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DA MÉDIA DO NÚMERO DE CÉLULAS/MM ² POR CLASSE HISTOPATOLÓGICA EM RELAÇÃO AOS MARCADORES DA IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA LINFÓCITOS T CD8 ⁺ E ESTIMADO DE CD4 ⁺ (CD4e*).....	48
GRÁFICO 18 -	DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA DO NÚMERO DE CÉLULAS/MM ² POR CLASSE HISTOPATOLÓGICA EM RELAÇÃO AO MARCADOR IMUNO-HISTOQUÍMICO BCL-2 PARA APOPTOSE.....	49
GRÁFICO 19 -	DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA DO NÚMERO DE CÉLULAS/MM ² POR MARCADORES CELULARES LINFOCITÁRIOS NAS CLASSES HISTOPATOLÓGICAS.....	78
GRÁFICO 20 -	DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA DO NÚMERO DE CÉLULAS/MM ² POR MARCADOR CELULAR DE NEUTRÓFILOS (CD15) E MACROFÁGICO (CD68) NAS CLASSES HISTOPATOLÓGICAS.....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -	TESTE DE WILCOXON RELACIONANDO AS CLASSES HISTOPATOLÓGICAS NO ESTUDO CONSIDERANDO A MÉDIA DE CÉLULAS POSITIVAS/MM ² NO ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	46
TABELA 02 -	À ESQUERDA, DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA DE CÉLULAS POSITIVAS/MM ² POR MARCADOR DA IMUNO-HISTOQUÍMICA EM CASOS COM E SEM CONTATO PRÉVIO COM ANTIMONIAL PENTAVALENTE. À DIREITA, TESTE DE MANN-WHITNEY U AVALIANDO ESSA RELAÇÃO.....	50
TABELA 03 -	À ESQUERDA, DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA DE CÉLULAS POSITIVAS/MM ² POR MARCADOR DA IMUNO-HISTOQUÍMICA EM CASOS COM E SEM GRANULOMAS. À DIREITA, TESTE DE MANN-WHITNEY U AVALIANDO ESSA RELAÇÃO.....	50
TABELA 04 -	À ESQUERDA, DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA DE CÉLULAS POSITIVAS/MM ² POR MARCADOR DA IMUNO-HISTOQUÍMICA EM CASOS COM E SEM IDENTIFICAÇÃO DE <i>LEISHMANIA</i> NO ESTUDO HISTOPATOLÓGICO. À DIREITA, TESTE DE MANN-WHITNEY U AVALIANDO ESSA RELAÇÃO.....	50
TABELA 05 -	PROTOCOLO DOS CRITÉRIOS HISTOPATOLÓGICOS PARA ANÁLISE QUALITATIVA DOS CASOS (MODIFICADO DE MAGALHÃES, 1997).....	72
TABELA 06 -	CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA (MAGALHÃES, 1997).....	72
TABELA 07 -	RELAÇÃO DOS CASOS UTILIZADOS NO ESTUDO COM DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS.....	75
TABELA 08 -	RELAÇÃO DOS CASOS COM OS ÍNDICES DOS CRITÉRIOS HISTOPATOLÓGICOS NUMA AVALIAÇÃO QUALITATIVA.....	76
TABELA 09 -	RELAÇÃO DOS PERFIS IMUNO-HISTOQUÍMICOS DOS CASOS COM O NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS/MM ² E O CD4E* (CD4 ESTIMADO) NUMA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA.....	77

TABELA 10 -	MÉDIA DE CÉLULAS POSITIVAS/MM ² E DESVIO PADRÃO EM RELAÇÃO AOS MARCADORES NAS CLASSES HISTOPATOLÓGICAS.....	77
TABELA 11 -	ANTICORPOS E SEUS RESPECTIVOS CLONES, DILUIÇÕES, CÓDIGOS E FABRICANTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

µm -	micrômetro
AP -	anatomopatológico
APCs -	células apresentadoras de antígeno
Bcl-2 -	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CD -	cluster of differentiation
CR -	receptor complementêmico
DCs -	células dendríticas
EDTA -	etiolo diaminotetraacetato de sódio
GIPLs -	fosfolípidos glicosilinositol
Gp63 -	glicoproteína 63
HE -	hematoxilina-eosina
HP -	histopatológica
HuB -	Hospital Universitário de Brasília
IFA -	imunofluorescência indireta
IHQ -	imuno-histoquímica
IL -	interleucina
INF-γ -	interferon-gama
iNOS -	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IRM -	intradermorreação de Montenegro
LCF -	<i>Leishmania chemotatic fator</i>
LPG -	lipofosfolídeo glicoconjugado
LTA -	Leishmaniose Tegumentar Americana
MFR -	receptor manose-fucose
MHC -	molécula de histocompatibilidade
Mm -	milímetros
MØ -	macrófagos
NK -	<i>natural killer</i>
NO -	óxido nítrico
NOS -	óxido nítrico sintetase
ORL -	otorrinolaringológico

PMNs -	polimorfonucleares neutrófilos
RC -	reação cicatricial
REC -	reação exsudativa celular
REG -	reação exsudativa granulomatosa
REN -	reação exsudativa necrótica
RENG -	reação exsudativa necrótico-granulomatosa
RES -	reação exsudativa e sarcoidiforme
RET -	reação exsudativa e tuberculóide
TBS -	Trizma Base Sigma
TGF -	<i>transforming growth factor</i>
Th -	<i>T helper</i>
TNF -	fator de necrose tumoral

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença parasitária endêmica, principalmente na região Centro-Oeste. A *Leishmania* é um parasita que através de seus antígenos secretados e não secretados desencadeiam, respectivamente, uma resposta imune predominantemente celular (inata e adquirida) e em menor proporção humoral. Na resposta inata participam o sistema complemento, polimorfonucleares, macrófagos e células *natural killer* numa resposta inicial. Desta resposta inicial, há produção de citocinas (IL-12 e INF- γ e TNF- α) que ativam linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ para resposta imune celular adquirida. A IL-12 diferencia os linfócitos T CD4 numa resposta Th1, com produção de INF- γ , ativação de macrófagos e resolução da doença. Enquanto, a IL-4 tem efeito reverso direcionando para uma resposta Th2 com diminuição da ativação de macrófagos, prevenindo o dano tecidual e permitindo a persistência do parasita. Foram descritos casos de pacientes com a forma mucosa da LTA do Hospital Universitário de Brasília, analisando dados epidemiológicos, clínico-laboratoriais e correlacionando com os aspectos histopatológicos e imuno-histoquímico (CD45ro, CD4, CD8, CD20, CD15, CD68 e Bcl-2). Perfil mais freqüente dos pacientes: sexo masculino, com média de idade de 50 anos, da região Centro-Oeste, com queixa de obstrução nasal e lesão de mucosa nasal infiltrada com ulceração e perfuração de septo ao exame otorrinolaringológico. A maioria com exames laboratoriais (IFA, inoculação em *hamster*, cultura, esfregaço e intradermoreação de Montenegro) compatíveis com a doença, sendo que em 44,44% dos casos foi possível a identificação da *Leishmania* por algum método auxiliar. Na histopatologia, de maneira geral, encontrou-se um infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário, às vezes acompanhado de uma reação granulomatosa com ou sem necrose. As classes histopatológicas encontradas foram: REC (reação exsudativa celular), REN (reação exsudativa necrótica), RENG (reação exsudativa necrótico-granulomatosa) e REG (reação exsudativa granulomatosa), sendo a primeira a mais freqüente (66,67%). Essas classes são estatisticamente significantes ($p < 0,05$) diferentes quando comparadas entre si em relação à quantidade de células positivas na imuno-histoquímica, exceto entre as classes REG e REN ($p > 0,05$). Esse estudo atestou a aplicabilidade e a praticidade do programa UnBVision na análise quantitativa das células nas reações imuno-histoquímicas. Na imuno-histoquímica, os linfócitos T predominaram em relação aos linfócitos B, comprovando que a doença tem reação imune mais celular do que humoral, sendo que dentre os linfócitos T, prevaleceu os linfócitos T CD4⁺ em relação aos linfócitos T CD8⁺, exceto em único exemplo de caso REG. Houve expressão considerável de Bcl-2 no infiltrado inflamatório. Grupos com contato prévio com o antimonial pentavalente e com presença de granulomas ou de *Leishmania* ao método histopatológico não tiveram significância estatística ($p > 0,05$) para explicar a diferença de número de células positivas para todos os marcadores aplicados no estudo. Em estudos complementares, o uso da imuno-histoquímica para identificar as citocinas e marcadores pró e antiapoptóticos podem contribuir para melhores esclarecimentos da imunopatologia da doença.

Palavras-chave: Leishmaniose, Histopatologia, Imuno-histoquímica, Citocina, Macrófago, Linfócitos T.

ABSTRACT

The American Integumentary Leishmaniasis (AIL) is a parasitic endemic disease, mainly in the Center-West region. *Leishmania* is a parasite that through its secreted and not secreted antigens trigger, respectively, a predominantly cellular immune response (innate and acquired) and to a lesser extent humoral. In the innate response, complement system, neutrophils, macrophages and natural killer cells work in an initial response. In this initial response, there is production of cytokines (IL-12, INF- γ and TNF- α) that activate T CD4+ and T CD8+ cells for acquired cellular immune response. The IL-12 action differentiates CD4 T cell to Th1 response and production of INF- γ , activation of macrophages and resolution of the disease. While the IL-4 has reverse effect directing to Th2 response with decreased activation of macrophages, this reaction prevents tissue damage and allows the persistence of the parasite. In this study, we have described patients with the mucosal form of AIL, they were treated in the University Hospital of Brasilia, analyzing epidemiological, clinical and laboratory data and correlating with the histopathologic features and the following immunohistochemical antibodies: CD45RO, CD4, CD8, CD20, CD15, CD68 and Bcl-2. Most common profile of patients: male, mean age 50 years, from Center-West region, with complaint of nasal obstruction and injury of nasal mucosa infiltrated with septum ulceration and perforation detected in the otorhinolaryngologic examination. Most of them with laboratory tests (indirect immunofluorescence, inoculation in hamster, smear, culture and Montenegro Skin Test) compatible with the disease, and in 44.44% of the cases it was possible the identification of *Leishmania* by some auxiliary method. In histopathology, in general, there was an inflammatory infiltrate lymphohistioplasmocitary sometimes accompanied by a granulomatous reaction with or without necrosis. The histopathological grades found were: ECR (exudative cellular reaction), ENR (exudative necrotic reaction), NEGR (necrotic-exudative granulomatous reaction) and EGR (exudative granulomatous reaction), the first one was the most frequent (66.67%) These classes are statistically significant ($p < 0.05$) different when compared to each other with the amount of positive cells in immunohistochemistry, except between ENR and EGR classes ($p > 0.05$). This study attested the applicability and practicality of the program UnBVision in quantitative analysis of cells in immunohistochemical reactions. In immunohistochemistry, the T cells were predominant on B cells, confirming that the disease as more cellular immune response than humoral, and in T cells, prevailed the CD4+ T on CD8+ T cells, except in only one instance case EGR. There was considerable expression of Bcl-2 in inflammatory infiltrate. In groups with previous contact with pentavalent antimony and presence of granulomas or *Leishmania* the histopathologic method were not statistically significant ($p > 0.05$) to explain the difference in the number of positive cells for all markers used in the study. In further studies, the use of immunohistochemistry to identify the cytokines and markers pro and antiapoptosis can contribute to better explanations of the immunopathology of disease.

Key words: Leishmaniasis, Histopathology, Immunohistochemistry, Citokines, Macrophage, T cell.

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença parasitária endêmica em mais de setenta países no mundo: 90% dos casos ocorrem em países da América do Sul, África e Ásia. É causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada de diversas espécies de flebotomíneos. Caracteriza-se pelo comprometimento de pele, mucosas e, raramente, linfonodos, com manifestações clínicas diversas, o que dificulta sobremaneira o diagnóstico. Dados mostram o aumento do número global de casos em países como Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Argélia, Paquistão, Peru e Brasil, não somente como consequência de melhores métodos diagnósticos e de notificação, mas também de um manejo inadequado dos vetores e hospedeiros, associação com outras doenças oportunistas e resistência emergente às drogas anti-leishmaniais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; REITHINGER et al., 2007).

Historicamente, trata-se de uma doença cutânea conhecida desde a Antigüidade por médicos árabes, como Avicenna no Oriente Médio e Pérsia. Mohammad e Muna Al-Taqui citam ocorrência de úlcera oriental por volta do século X. Na Índia, em 1885, Cunningham foi o primeiro a observar os parasitas, em casos de Calazar, e Borovisky, em 1898, em casos da forma cutânea. O termo *Leishmania* é criado por Ross em 1903. Em 1908, Leishman reconhece a forma semelhante da *Leishmania* com as encontradas em infecções pelo *Trypanosoma* e Donovan descreve o parasita no Calazar (MEDEIROS & ROSELINO, 1999).

Na América, em 1586, Rodrigo Loayza fez os primeiros relatos de lesões nasais em índios e colonizadores espanhóis na região do Andes. Sendo que no Brasil, em 1917, Rabelo fez referências a uma viagem feita por Frei Don Hipólito Sanchez Rangel de Fayos y Quirós de Tabatinga ao Pará com menção da doença na região amazônica. Moreira, em 1895, identifica a existência do botão endêmico dos países quentes, sendo denominado botão da Bahia. Mas foi no início do século XX, com a construção da Estrada de Ferro Noroeste que surgiu, no estado de São Paulo, uma epidemia de úlceras cutâneas que, mais

tarde, afetavam as mucosas dos operários. Foi quando então cresceu o interesse pelo estudo da doença que recebeu várias denominações como úlcera de bauru, feridas bravas, úlcera do noroeste, entre outras (MEDEIROS & ROSELINO, 1999).

Em 1909, Lindenberg identificou os corpúsculos de Leishman Wright, confirmados posteriormente por Carini e Paranhos. Miranda, em 1910, descreveu o primeiro caso da forma mucosa em São Paulo e, no mesmo ano, Splendore encontra o parasita em lesões mucosas. Em 1911, Pedroso e Silva obtém culturas de *Leishmania* em meio NNN (Nicole-Novy-MacNeal) e Gaspar Vianna descreve a morfologia do *Leishmania braziliensis*. Vianna, em 1912, descobre o tratamento endovenoso da Leishmaniose com injeções endovenosas de tártaro emético (MEDEIROS & ROSELINO, 1999).

O parasita *Leishmania* pertence ao reino *Protozoa*; filo *Mastigophora*; ordem *Kinetoplastida*; família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. No Novo Mundo (Américas), são conhecidas onze espécies de *Leishmania* dermatotrópicas, causadoras de doenças em humanos, e outras oito já descritas somente em animais. No Brasil, as três principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MEDEIROS & ROSELINO, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No ciclo de vida, as fêmeas dos insetos vetores adquirem, no repasto ao anoitecer, a forma amastigota da *Leishmania* de humanos (antropnose) ou outros mamíferos infectados (zoonose). As formas amastigotas adquiridas pelo mosquito estão no interior dos macrófagos e medem 2 a 3 μm de diâmetro, com forma ovóide, núcleo excêntrico e citoplasma claro, em que se encontra a estrutura mitocondrial especializada – cinetoplasto. Os insetos são dípteros pequenos (2 a 3 mm de tamanho) pertencentes à família *Psychodidae* e a diversos gêneros: *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, Ásia e África), *Lutzomyia* e, mais raramente, *Psychodopygus* no Novo Mundo. Embora a grande maioria das formas de transmissão da *Leishmania* ainda seja zoonótica, as mudanças ambientais causadas pela aproximação do homem com as florestas, seja por meio de desenvolvimento agrícola ou habitacional, estão alterando essa realidade

(MEDEIROS & ROSELINO, 1999; CUNNINGHAM, 2002; AWASTHI et al., 2004; MURRAY et al., 2005; REITHINGER et al., 2007).

A forma mucosa da LTA no Brasil é causada principalmente pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*, com distribuição abrangente no Brasil, compreendendo a Amazônia, regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país. Essa espécie tem como vetores: *Psychodopygus wellcomei*, identificado na Amazônia e Ceará, de hábitos noturnos, mas que pode picar o homem durante o dia; a *Lutzomyia intermedia*, de áreas endêmicas litorâneas dos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e grandes vales dos rios do interior do Paraná; e o *Lutzomyia whitmani* no estado de Minas Gerais e em áreas do interior da Bahia (Três Braços). Seus hospedeiros naturais são mamíferos selvagens, sendo o homem um hospedeiro incidental, assim como roedores domésticos, cães, eqüinos e gatos (MEDEIROS & ROSELINO, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

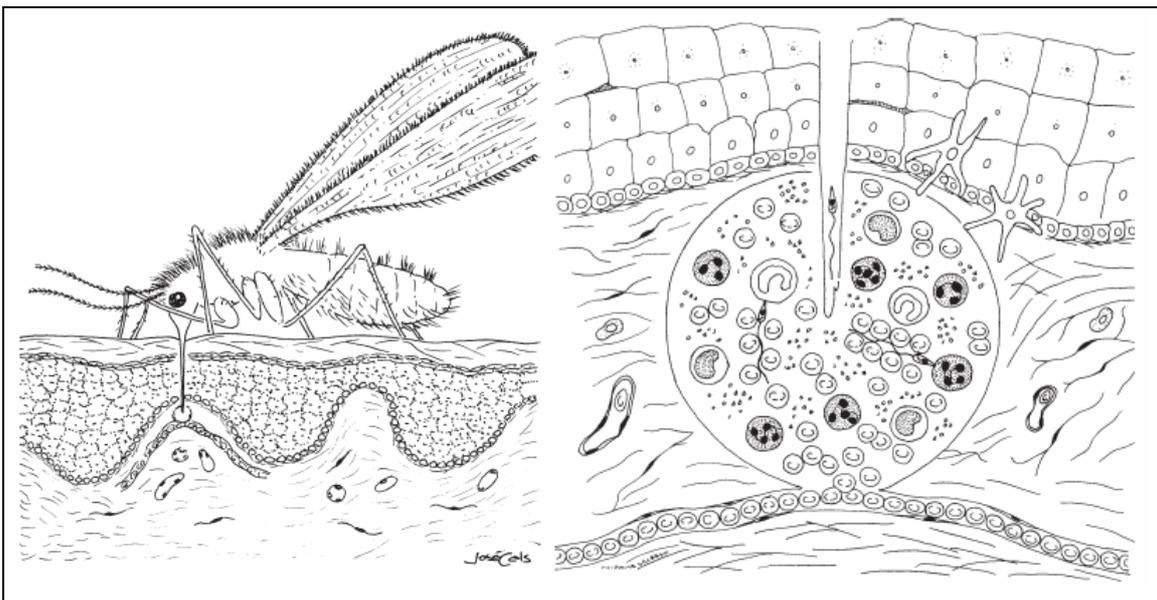


Figura 01- Picada do Flebotomíneo alcançando vasos da derme superficial (à esquerda) e formação do "lago" hemático com formas promastigotas (à direita). No "lago" hemático, há adesividade do parasita com eritrócitos, macrófago (à esquerda do probóscido) e neutrófilos (à direita do probóscido); à direita, duas células de Langerhans da região dermo-epidérmica (ALMEIDA et al., 2003).

Seguindo o ciclo evolutivo, as formas são libertadas no intestino do vetor em formas promastigotas procíclicas, alongadas, medindo 15-26x3µm de diâmetro, com núcleo central e flagelo. Essas formas aderem-se às células epiteliais intestinais, nas quais vivem extracelularmente e se multiplicam por

divisão binária. As formas procíclicas expressam moléculas curtas de lipofosfoliglicano glicoconjugado (LPG) que cobre toda a superfície do parasita, inclusive o flagelo (CUNNINGHAM, 2002; AWASTHI et al., 2004).

Segue então o processo de metaciclogênese, em que as formas promastigotas procíclicas não infectivas são transformadas em formas promastigotas metacíclicas virulentas. Essas se despreendem das células epiteliais do intestino e migram para a faringe do mosquito. Quando pica o hospedeiro (Figura 01), ele insere o probóscido na derme superficial, lacerando pequenos vasos e com a formação de um “lago” hemático, em que ele se alimenta. Nesse repasto, as formas metacíclicas promastigotas passam para o hospedeiro, onde serão incorporadas nos fagolisossomos dos macrófagos e se diferenciarão na forma amastigota. Estas se proliferam e rompem os macrófagos infectados, libertando-se para infectar novos macrófagos e reiniciar o ciclo (CUNNINGHAM, 2002; ALMEIDA et al., 2003).

2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA

Várias espécies de *Leishmania* podem causar a LTA em humanos, embora a maioria das infecções permaneça assintomática. Assim propriedades do parasita (infectividade, patogenicidade e virulência) e fatores do hospedeiro regem a heterogênea expressão da doença e suas manifestações clínicas. Além disso, ainda há a influência da espécie do parasita e da região endêmica (MURRAY et al., 2005; REITHINGER et al., 2007).

O primeiro sinal de infecção é tipicamente um discreto eritema que se desenvolve variavelmente no local da picada do inseto e evolui para uma pápula e, posteriormente, um nódulo. Esse tende a ulcerar-se no período de duas semanas a seis meses formando a lesão cutânea típica da LTA que pode variar no tamanho, apresentação (localizada/disseminada) e evolução clínica. O período de incubação no Novo Mundo varia de 2 a 8 semanas. Em 90% dos casos pode ocorrer a cicatrização espontânea entre 3 e 18 meses, resultando, usualmente, em uma proteção contra a doença que pode ou não ser restrita a mesma espécie de *Leishmania* (PISCOPO & AZZOPARDI, 2006; MURRAY et al., 2005; REITHINGER et al., 2007).

As formas clínicas da LTA incluem a forma cutânea (localizada única e múltipla, recidiva cútis e disseminada), cutânea difusa e mucosa (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

2.1.1 Formas mucosas

O envolvimento mucoso na LTA é incomum e resulta da disseminação hematogênica ou linfática de amastigotas da pele para mucosa nasal, oral, orofaringe e laringe. Na maioria dos casos, a forma mucosa da LTA torna-se evidente depois de alguns anos de resolução de uma lesão cutânea

prévia, mas também pode ocorrer enquanto lesões na pele ainda estão presentes (DA-CRUZ et al., 2002; MOTTA et al., 2007).

As formas mucosas reconhecidas são a primária, tardia, indeterminada, contígua e concomitante (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

Na forma primária, a lesão de mucosa é causada diretamente pela picada do mosquito, sendo então restrita às possibilidades de lesões localizadas em lábios e genitais. A forma mucosa tardia ocorre quando há comprometimento da mucosa anos após o surgimento da lesão cutânea. A forma mucosa indeterminada não é precedida de manifestação clínica cutânea prévia, sendo então a primeira manifestação da LTA mucosa. Na forma contígua, o envolvimento da mucosa ocorre em decorrência da expansão de uma lesão cutânea pré-existente e na forma mucosa concomitante há aparecimento simultâneo da lesão mucosa quando existe uma lesão cutânea ativa (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

2.2. *Leishmania*: ANTÍGENOS SECRETADOS E NÃO SECRETADOS.

A *Leishmania* dentro do hospedeiro possui um conjunto de antígenos que afetam o sistema imune e a produção de citocinas, facilitando a perpetuação do processo infeccioso. Dois grupos de moléculas parasitárias estão envolvidos nesse processo: as moléculas secretadas/superfície e as não secretadas/intracelulares, sendo as primeiras moléculas as principais determinantes dos mecanismos invasivos/evasivos (SANTARÉM et al., 2007).

O enfoque nas moléculas de superfície e secretadas está na LPG, na protease de superfície promastigota glicoproteína 63 (gp63), nos fosfolípidos glicosilinositol (GIPLs), nas peptidases cisteínicas, proteases β -mercaptoetanol ativadas, fosfatases e quitinases. A importância de algumas dessas moléculas são bem documentadas no processo infeccioso, mas a real contribuição das moléculas secretadas permanece indescritível devido à dificuldade de estudos intra-macrofágicos (SANTARÉM et al., 2007).

Dentre os antígenos não secretados, designados como panantígenos, destacam-se as histonas, proteínas de choque térmico e proteínas ribossômicas. Ao contrário dos antígenos de superfície, os panantígenos não são prontamente expostos e processados pelo sistema

imune. Para que haja esse processamento, antes é necessária a destruição do parasita. Assim, umas das fontes desses antígenos são os parasitas inoculados inicialmente pelo vetor e que são destruídos. Outras origens dessas proteínas incluem a citólise de amastigotas intracelulares nos macrófagos (SANTARÉM et al., 2007).

Enquanto os antígenos de superfície são responsáveis no desenvolvimento de uma resposta imune celular (células T e macrófagos), os antígenos não secretados parecem estar envolvidos no desenvolvimento de uma resposta humoral exuberante, mediada por anticorpos (SANTARÉM et al., 2007).

2.3 IMUNOPATOLOGIA

2.3.1 Resposta imune inata

Após inoculação das formas promastigotas de *Leishmania* na derme, pelos vetores, há desencadeamento de uma resposta com fatores séricos (sistema complemento) e inflamatória aguda inespecífica celular (polimorfonucleares neutrófilos, células *natural killer* e macrófagos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Via sistema complemento (Figura 02), há tentativa de remover os parasitas pela lise de membrana. As formas metacíclicas promastigotas de *Leishmania* ativam o sistema complemento, tanto pela via clássica quanto alternativa, com opsonização, formação do complexo de ataque à membrana C5b-C9e e conseqüente lise, de forma rápida, dos parasitas. Isto resulta na morte de aproximadamente 90% dos parasitas inoculados no prazo de 3 minutos (STEBUT, 2007).

A opsonização por C3bi também permite adesão aos receptores complementêmicos (CR) 1 dos eritrócitos (aderência imune), permitindo uma disseminação local no tecido e para outros sítios mais distantes (STEBUT, 2007).

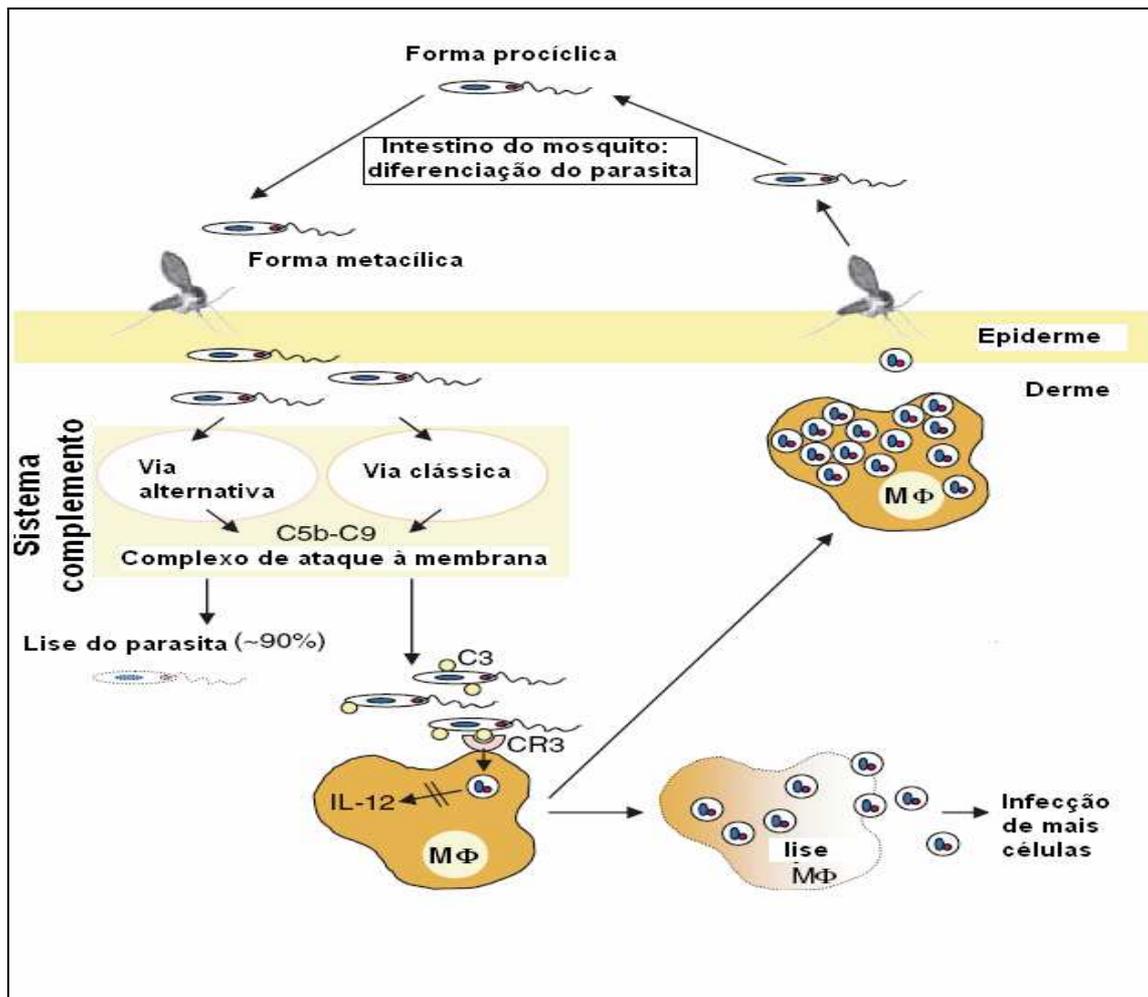


Figura 02 - Ação do sistema complemento logo após a inoculação dos parasitas na derme. A *Leishmania* é parcialmente lisada e as sobreviventes utilizam o C3 para invadirem macrófagos (MΦ) do hospedeiro, via CR3, e dentro deles se transformam em formas intracelulares obrigatórias: amastigotas. Dentro dos macrófagos, a falta de ativação celular, pela inibição da liberação de IL-12, faz com que o parasita se replique. Após a lise do MΦ, os parasitas são liberados para infectar mais células (STEBUT, 2007).

Os polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) são as primeiras células a migrarem ao local de infecção ou de lesão tecidual, funcionando como células efetoras e fagocíticas primárias. As formas promastigotas da *Leishmania* são capazes de liberarem o LCF (*Leishmania chemotatic fator*), um fator potente quimiotático de neutrófilos e não de outros leucócitos, como monócitos e células NK (*natural killer*). Uma vez ingeridas, as partículas estranhas são destruídas por enzimas proteolíticas contidas nos grânulos citoplasmáticos e pela produção de radicais de oxigênio. Em seqüência, há produção neutrofílica de interleucina-8 (IL-8) com recrutamento de mais neutrófilos para o local da infecção. Como mecanismo de parasitismo, isso é benéfico para a *Leishmania* já que direciona o processo inflamatório para uma

resposta imune inespecífica, escapando de células mais efectoras, como os macrófagos, e permitindo que o parasita persista no tecido (AWASTHI et al., 2004).

Os PMNs têm vida curta de 6 a 10 horas na circulação sanguínea, quando então sofrem apoptose. A *Leishmania* atrasa, mas não previne, a apoptose dos neutrófilos infectados para 2 a 3 dias, pela inibição das caspases-3, a qual é conhecida na indução da apoptose em neutrófilos de vida curta. Os PMNs também inibem a atividade dos linfócitos T *helper* 1 (Th1) e NK, pela inibição de interferon-gama (INF- γ). (AWASTHI et al., 2004).

Os PMNs podem ser divididos em células CD28⁺ ou CD28⁻ (CD – *cluster of differentiation*), sendo que os primeiros têm a capacidade de interagir com CD80/86 dos macrófagos induzindo produção de INF- γ e fatores quimiotáticos de células T. Tendo assim ação inicial de começar a resposta imune de células T contra a *Leishmania* (VENUPRASAD et al., 2002).

Dois a três dias mais tarde, há entrada de monócitos e macrófagos no local do processo inflamatório, pela produção de quimiocinas indutoras *macrophage inflammatory protein-1alfa* (MIP-1 α) e MIP-1 β . Os macrófagos fagocitam os PMNs infectados pela identificação de fosfatidil na superfície das células inflamatórias, assim não há ativação das funções antimicrobianas dos macrófagos, sendo uma via ideal e silenciosa de entrada da *Leishmania* nas células do hospedeiro (AWASTHI et al., 2004).

Os macrófagos apresentam várias funções: permitem a replicação do parasita, mas também funcionam como apresentadoras de antígenos (APCs) e fonte de citocinas que modulam a resposta imune mediada pelas células T (TEIXEIRA et al., 2006).

A adesão da *Leishmania* ao macrófago é um pré-requisito para a fagocitose da mesma (MAUËL, 1990).

As duas principais moléculas de superfície da *Leishmania*, LPG e gp63, em contato com as frações C3b e C3bi do sistema complemento, interagem com CR1 e CR3 da superfície de macrófagos. Isso permite a internalização do parasita no macrófago (LODGE & DESCOTEAUX, 2005).

Outros receptores estão envolvidos na interação macrófago-*Leishmania*: CR4, receptor fibronectina, receptor Fc de gama imunoglobulina,

receptor manose-fucose (MFR) e receptor da galectina-3. (HANDMAN & BULLEN, 2002; PETER & SACKS, 2006).

As formas promastigotas (Figura 03) aderem aos macrófagos através destes receptores e são internalizadas em um fagossomo que funde com o lisossomo para formar o fagolisossomo ou vacúolo parasitóforo. Uma vez dentro do macrófago, a forma promastigota sofre mudanças bioquímicas e metabólicas culminando na forma de parasita intracelular obrigatório: a amastigota. Estas serão liberadas pela lise macrofágica e podem invadir novamente células dendríticas (DCs), fibroblastos e outros macrófagos (HANDMAN & BULLEN, 2002).

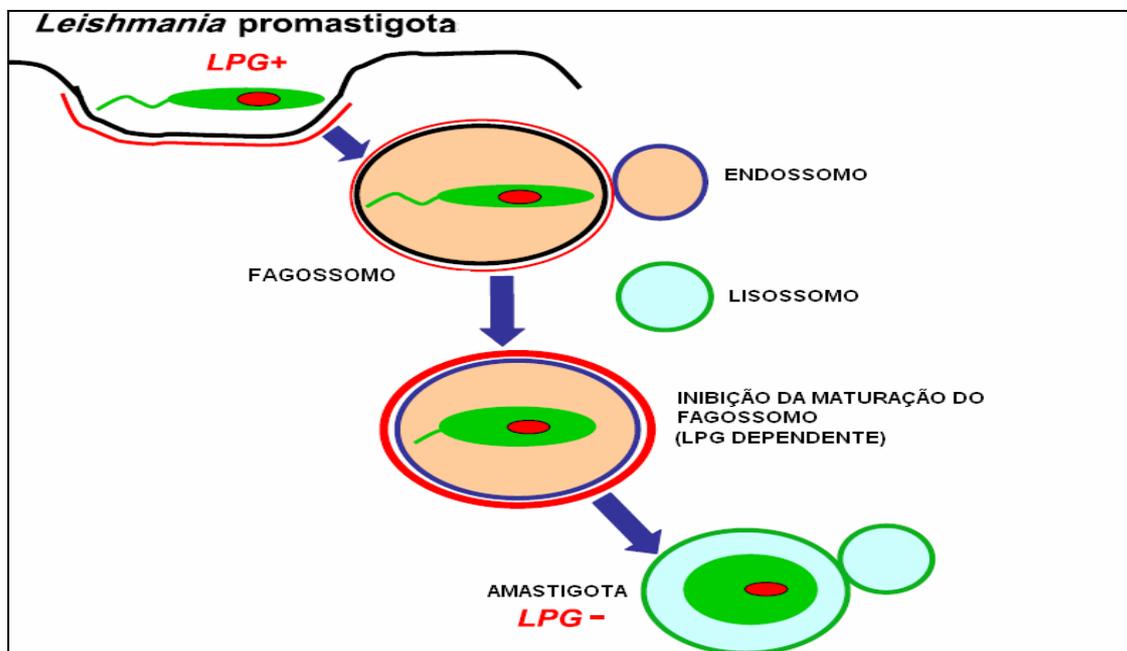


Figura 03 - Fagocitose da forma promastigota e formação da forma amastigota (HANDMAN & BULLEN, 2002).

Primariamente, os macrófagos tentam eliminar a *Leishmania* através de metabólitos tóxicos do oxigênio, como ânion óxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) (AWASTHI et al., 2004).

Posteriormente, os macrófagos ativados produzem diferentes citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-18, IL-12, IL-6 e INF- γ . (AWASTHI et al., 2004).

A IL-12 é um efetivo adjuvante e um pré-requisito para a resposta imune Th1 na maioria das infecções parasitárias intracelulares, produzidas pelas células apresentadoras de antígenos como macrófagos e DCs. A

interação do CD40 da superfície do macrófago com o CD40L da superfície dos linfócitos T ativados, induz a expressão e produção de IL-12, a qual ativa células T a produzir INF- γ . A IL-18 é outra citocina pró-inflamatória que ajuda a evocar resposta imune Th1 em colaboração com a IL-12. O INF- γ participa de forma atuante na produção de NO através da *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), tendo o TNF- α uma importante citocina que atua de forma sinérgica, dentre várias outras como IL-2, IL-4 E IL-7 (AWASTHI et al., 2004).

Embora o macrófago tenha mecanismos efetores que protegem o hospedeiro dos parasitas intracelulares, estes possuem mecanismo adaptativos que evadem e modulam a resposta inflamatória como forma de persistência no tecido (AWASTHI et al., 2004).

Outras células adjuvantes na resposta imune inata são as DCs e as células NK (TEIXEIRA et al., 2006).

As DCs são potentes APCs e podem induzir eficientemente a ativação de células T. Além do que, são também fonte de diferentes citocinas como IL-12, IL-10 e INF- γ (TEIXEIRA et al., 2006).

As DCs cutâneas têm papel decisivo no desenvolvimento na diferenciação dos subtipos de células T. Estas células sensibilizadas pela *Leishmania* adquirem maturação fenotípica pela regulação positiva na expressão de moléculas de histocompatibilidade (MHC) classes I e II, aumentando sua expressão de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD54, CD80 e CD86), liberação de IL-12 e transporte de parasitas da pele para linfonodos regionais onde acontece a apresentação antígeno específica para células T (TEIXEIRA et al., 2006).

A contribuição dos subtipos de DCs (células de Langerhans epidérmicas, DC dérmicas e DC linfonodais) na indução de uma resposta imune protetora ainda é motivo de estudos (STEBUT, 2007).

Alguns estudos sugerem que a *Leishmania* é capaz de atrasar a maturação das DCs para favorecer a infecção antes que se estabeleça a resposta imune adquirida (BRANDONISIO et al., 2004).

As células NK chegam ao local da infecção nas primeiras 24 horas. Elas têm com ação citotóxica e, além disso, são fontes primárias INF- γ , ajudando a desenvolver uma resposta imune protetora (TEIXEIRA et al., 2006).

2.3.2 Resposta imune adquirida: ação das células T

Está bem documentado que as células T (Figura 04) podem se diferenciar em células efetoras tipo Th1 e Th2. Muitos estudos tentaram definir o paradigma Th1/Th2 de resistência/ susceptibilidade à infecção e o papel das IL-12 e IL-4. (AWASTHI et al., 2004; ALEXANDER & BRYSON, 2005).

A IL-4 é conhecida por induzir a diferenciação Th2, enquanto a IL-12 induz a Th1 (AWASTHI et al., 2004).

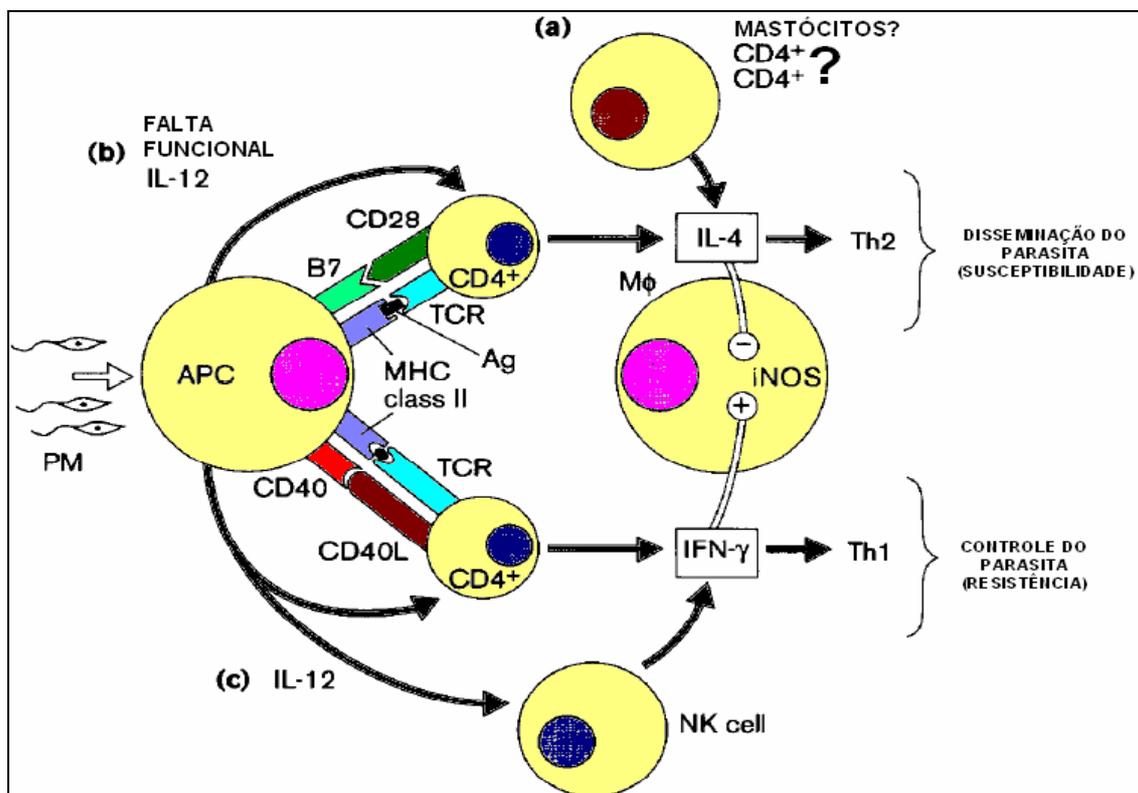


Figura 04 - Resposta imune adquirida na Leishmaniose (AWASTHI et al., 2004).

A secreção de IL-12 pelas DCs ajuda a direcionar uma imunidade celular protetora com a ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺. Essas células efetoras circulantes são recrutadas para os locais de infecção na pele através de mecanismos de adesão, moléculas e citocinas, com posterior afluxo de monócitos circulantes para uma resposta inflamatória local direta, incluindo a formação de granulomas e o desenvolvimento da lesão. Resposta predominante com células T CD4⁺ Th1 é associada com ativação macrofágica induzida por IFN-γ indicando uma via em que a IL-12 modula a resposta imune básica, além de outras citocinas adjuvantes como a IL-2 e TNF. As células T

CD8⁺ também produzem INF- γ e promovem o desenvolvimento da subpopulação de células T CD4⁺ Th1 e resolução da doença (MURRAY et al., 2005).

A apresentação de antígenos por MHC classe II unicamente não é suficiente para estimular uma resposta por células T. A ligação de moléculas co-estimulatórias B7-1/B7-2 e CD40, nas APCs, com as moléculas CD28 e CD40L, dos linfócitos T, respectivamente, são também um pré-requisito. Ligação CD40/CD40L melhora a produção de IL-12 pelas APCs, bem como de TNF. A produção de INF- γ pelas células Th1, como parte da resposta imune adquirida, e pelas células NK, como parte da resposta imune inata, media a ativação macrófaga, produção de NO e morte dos parasitas (ALEXANDER & BRYSON, 2005).

Num ambiente inflamatório, mecanismos contrabalanceadores normalmente ocorrem para alterar o processo. Na LTA, há ação e geração de citocinas supressoras. Citocinas associadas a uma resposta Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13) e *transforming growth factor* β (TGF- β) são capazes de desregular a resposta imune Th1 e inativar macrófagos. Dessa forma, moderam injúria tecidual, mas promovem a persistência da infecção intracelular (MURRAY et al., 2005).

Em pacientes com infecção clínica aparente, as respostas Th1 e Th2 não são caracteristicamente polarizadas como em alguns estudos experimentais, pois estão atuando citocinas que ativam (IL-12 e INF- γ) e as que suprimem (IL-10, IL-13, IL-4 e TGF- β) a resposta celular. Assim, talvez afetada por alguns fatores genéticos, a infecção progressiva não cicatrizante parece indicar provavelmente uma resposta supressiva (Th2>Th1) do que uma resposta Th1 inerte. Até porque a persistência do processo inflamatório é uma marca da LTA clinicamente aparente (MURRAY et al., 2005).

Após um longo tempo de infecção, em linfonodos de camundongos que se recuperaram da doença com *Leishmania major*, estudos constataram que macrófagos e DCs ainda abrigavam parasitas viáveis. Contudo, somente DCs são capazes de induzir uma vigorosa resposta imune por células T em resposta ao *Leishmania major in vitro*. Assim, DCs em linfonodos representam células do hospedeiro que suportam a manutenção das células T de memória pela persistência do parasita. Em adição, IL-12 tem que

estar continuamente presente para a manutenção de uma imunidade protetora eficiente. As fontes de IL-12 em estágios tardios pós-infecção não são bem conhecidas, mas DCs infectadas são uma delas. Assim, camundongos deficientes de IL-12, INF- γ e NO são extremamente susceptíveis à infecção (STEBUT, 2007).

Dessa forma, proteção em longo prazo à reinfecção parece ser associada com a persistência de parasitas residuais em órgãos linfóides. Contudo, estudos recentes sugerem que células T CD4⁺ responsáveis por uma imunidade protetora contra *Leishmania major* incluem duas populações celulares: células T efetoras parasito-dependentes e células T de memória central parasito-independentes. Sendo que estas não requerem a presença continuada de parasitas vivos para sua existência a longo prazo. Com o recontato com *Leishmania major*, estas células expandem e promovem proteção eficiente (STEBUT, 2007).

Em formas crônicas de LTA, a IL-10 é outra citocina produzida por células T regulatórias que servem para limitar a magnitude das respostas efetoras e, dessa forma, responsável pela falha de um adequado controle da infecção. Assim, alguns estudos demonstram resultados marcantes do efeito da ação terapêutica anti-receptores Ab de IL-10 em infecções crônicas como forma de evitar a reativação da doença (BELKAID et al., 2001; STEBUT, 2007).

2.4 HISTOPATOLOGIA E OS PADRÕES DE REAÇÃO

Em biópsias, coradas pela técnica da hemotoxilina-eosina (HE), formas amastigotas (Figura 05 e 13) são visualizadas como pequenos elementos ovalados ou piriformes, com citoplasma claro, núcleo discretamente basofílico e cinetoplasto puntiforme ou em forma de barra, também basofílico. Elas são encontradas em meio às células inflamatórias e dentro do citoplasma de macrófagos/DCs, onde podem ter sua forma não tão bem definida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

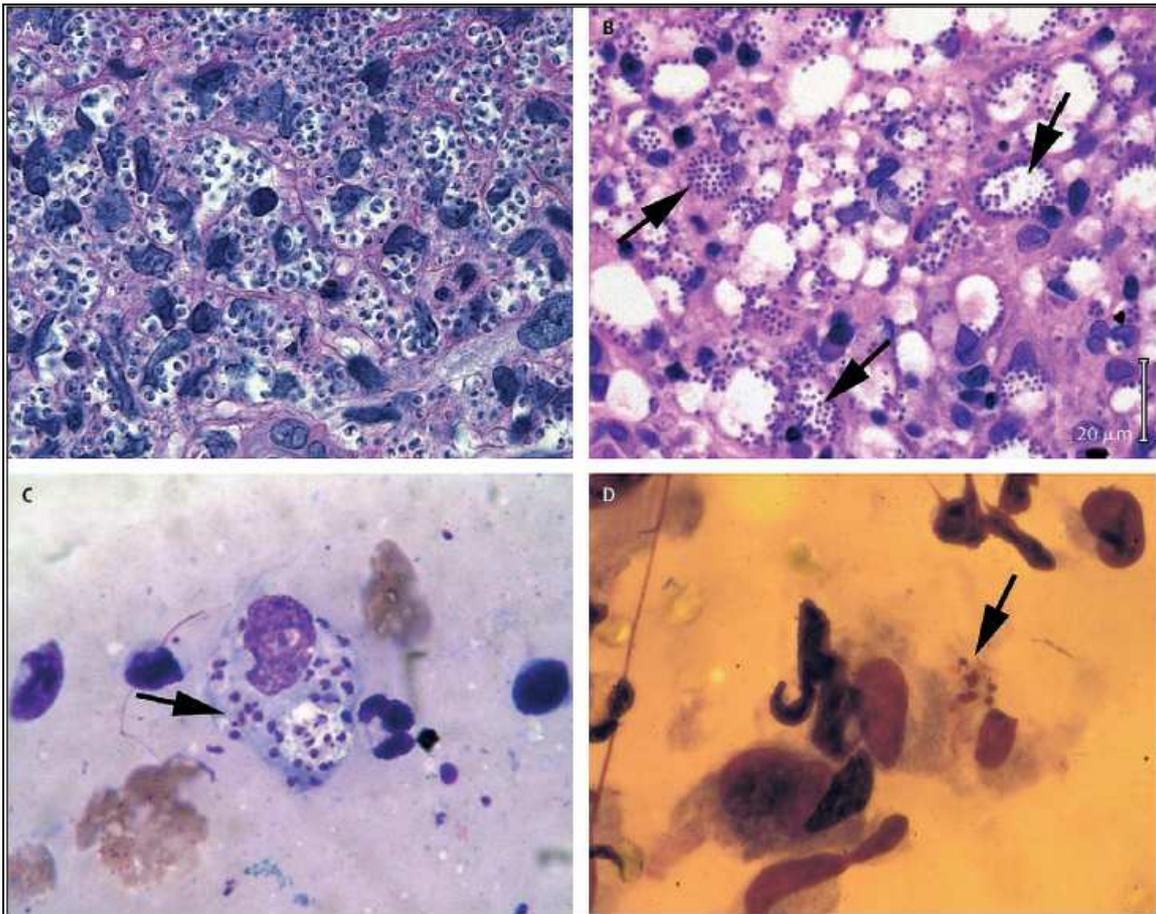


Figura 05 – Diagnóstico histopatológico da LTA. Biópsias (A e B) e esfregaços (C e D): macrófagos contendo *Leishmania* no citoplasma (MURRAY et al., 2005).

De forma geral, o quadro histopatológico da LTA está representado por um infiltrado celular histiolinfoplasmocitário (padrão exsudativo celular), acompanhado por uma reação granulomatosa que pode surgir associada ou não à necrose (MAGALHÃES, 1986).

Dos padrões histopatológicos presentes na LTA, o exsudativo celular constitui o primeiro padrão de reação à presença do parasito no tecido, pois seus tipos celulares são verificados em maior ou menor proporção nos demais padrões (MAGALHÃES, 1986).

Na interação *Leishmania*/hospedeiro, transcorre uma resposta imune celular e humoral, com desenvolvimento de mecanismo necrosante, lise intracelular e granulomas organizados (hipersensibilidade do tipo tardia). Com a necrose, há produção de um granuloma organizado com células gigantes e epitelióides. Na baixa carga antigênica, o mecanismo de necrose é dependente da presença plasmócitos e linfócitos, que são recrutadas para a imunidade celular e humoral (RIDLEY, 1979)

Como constatou MAGALHÃES (1986), sistematicamente, na forma cutânea da LTA, são descritos os seguintes padrões de reação:

a) Ausência de lesão ou lesão mínima: sem infiltrado inflamatório significativo ou granulomas.

b) Reação exsudativa celular (REC): infiltrado histiolinfoplasmocitário do córion da mucosa com proporções celulares que tendem para a equivalência.

c) Reação exsudativa celular e necrótica (REN): necrose tissular de amplitude e formato variáveis associada à vasculite aguda, no seio do infiltrado histiolinfoplasmocitário.

d) Reação exsudativa e necrótico-granulomatosa (RENG): reação granulomatosa desorganizada nas proximidades de área de necrose tissular, com presença de células gigantes, macrófagos ativados e infiltrado histiolinfoplasmocitário associado.

e) Reação exsudativa e granulomatosa (REG): reação granulomatosa desorganizada sem a presença de necrose tissular, no seio do infiltrado histiolinfoplasmocitário;

f) Reação exsudativa e sarcoidiforme (RES): granulomas com células epitelióides, bem formados e organizados, semelhantes aos encontrados na Sarcoidose

g) Reação exsudativa e tuberculóide (RET): granulomas organizados com células epitelióides, células gigantes tipo Langhans e coroa linfocitária externa, semelhantes aos encontrados na Tuberculose.

h) Reação cicatricial (RC): reação observada após a cura clínica com presença de escassos linfócitos em meio à fibrose no córion.

2.5 APOTOSE E LEISHMANIOSE

Apoptose ocorre em numerosos eventos fisiológicos e patológicos e trata-se da morte celular programada pela ação de enzimas que degradam o DNA celular e as proteínas plasmáticas. Não há desencadeio de processo inflamatório porque a membrana celular permanece intacta, mas a estrutura celular é alterada. Ocorrem retração celular, condensação e marginação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (KUMMAR et al., 2005).

Duas vias moleculares distintas e convergentes são responsáveis pela apoptose: a extrínseca e intrínseca. Elas resultam na ativação da cascata das caspases, que são as proteases que atuam em uma série de proteínas celulares e, portanto, responsáveis pelas alterações morfológicas características da apoptose (KUMMAR et al., 2005).

A via extrínseca (morte iniciada por receptor) é desencadeada por sinais que surgem dos receptores na superfície celular como fator de necrose tumoral (TNF) e o Fas (CD95) que são ativados por ligantes. (KUMMAR et al., 2005).

A via intrínseca (mitocondrial) da apoptose resulta do aumento permeabilidade mitocondrial pelo desequilíbrio de enzimas pró-apoptóticas (Bak e Bax) e anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-x) da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Há liberação do citocromo *c* no citosol que desencadeia a ativação das caspases. Essa via pode ser iniciada por vários estímulos como radiação, privação de hormônios e citocinas (KUMMAR et al., 2005).

Na LTA, assim como em outras doenças parasitárias, a apoptose pode ser induzida tanto nos parasitas quanto nas células da resposta imune do hospedeiro. Os mecanismos envolvidos em espécies do gênero *Leishmania*, bem como a importância desse evento na patogênese da doença, ainda não estão bem definidos (NGUEWA et al., 2004).

3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A imuno-histoquímica é a aplicação dos princípios imunológicos da ligação antígeno-anticorpo para o estudo de células e tecidos. O método consiste da utilização de anticorpos específicos previamente conhecidos e manipulados quimicamente para que se liguem aos seus antígenos tissulares ou celulares correspondentes. Devido a diversas reações e o uso de cromógenos, existe produção de cor que se torna visível ao microscópio óptico, permitindo localizar o antígeno em estudo. Na rotina em laboratório de Patologia, a imuno-histoquímica é utilizada na elucidação da histogênese de neoplasias indiferenciadas, determinação de sítio primário de metástases, classificação de linfomas, expressão de fatores prognósticos e índices proliferativos de neoplasias, identificação de microorganismos e de materiais secretados por células (WERNER et al., 2005).

No âmbito da pesquisa científica, a imuno-histoquímica é uma ferramenta que também pode ser utilizada no estudo *in situ* do infiltrado inflamatório de doenças neoplásicas, degenerativas e infecciosas. Apesar de ser uma metodologia relativamente simples, a imuno-histoquímica tem certas particularidades e seus resultados são influenciados por diversos fatores, como fixação dos tecidos, tipo dos anticorpos a serem analisados e pelas reações propriamente ditas, além da própria interpretação das lâminas. (WERNER et al., 2005).

Neste estudo foi realizado o seguinte perfil imuno-histoquímico: CD45ro, CD20, CD68, CD15, CD4, CD8 E Bcl-2. Para cada anticorpo foi utilizado controle para verificar o funcionamento da reação em tonsilas palatinas.

O CD45 é um marcador das células hematolinfóides. A sua isoforma restrita CD45ro é encontrada na células T em geral e tímócitos (www.e-immunohistochemistry.info).

Os linfócitos B maduros representam 10 a 20% da população de linfócitos periféricos circulantes e são marcados pelo anticorpo anti-CD20. À estimulação antigênica, as células B formam plasmócitos que secretam

imunoglobulinas mediadoras da resposta humoral. Os plasmócitos são CD20 negativos (ALVES et al., 1999; KUMAR et al., 2005; www.e-immunohistochemistry.info).

O CD68 é o marcador de macrófago mais utilizado na rotina. O antígeno é expresso por uma proteína citoplasmática associada aos lisossomos de monócitos e macrófagos (<http://www.e-immunohistochemistry.info>).

O CD15 é um marcador predominante de granulócitos maduros e em alguns linfócitos T ativados. O uso do anticorpo anti-CD15 é utilizado, sobretudo, na identificação dos polimorfonucleares nos processos inflamatórios (ALVES et al., 1999; www.e-immunohistochemistry.info).

O CD4 é um co-receptor que atua na ativação de linfócitos T *helper* restritos à apresentação antigênica pela MHC II. Na reação imunohistoquímica é um marcador citoplasmático com acentuação do contorno da membrana celular (www.e-immunohistochemistry.info).

O CD8 é o antígeno de células T supressoras/citotóxicas que serve como receptora para moléculas do MHC I. Como controle de reação, sabe-se que o anticorpo anti-CD8 marca 15-20% das células T das áreas interfoliculares dos linfonodos e cerca de 80% das células T intestinais e da medula óssea. Na rotina, é utilizado em conjunto com o CD4 para estabelecer a relação entre as duas populações de linfócitos T (ALVES et al., 1999; www.e-immunohistochemistry.info).

O gene Bcl-2 é localizado no cromossomo 18. O produto do gene Bcl-2 é uma proteína da membrana mitocondrial externa que inibe a apoptose, prolongando a sobrevivência celular. Normalmente é expresso em muitas células T e pequenos linfócitos B do manto e da zona marginal de linfonodos, os quais são utilizados como controle da reação para esse marcador (www.e-immunohistochemistry.info).

4 JUSTIFICATIVA

De ampla distribuição mundial, a LTA tem estimulado investigações e estudos comparativos que possam identificar ocorrências comuns no comportamento desta doença. Por se tratar de uma doença que incide principalmente na população de baixa renda e em países em desenvolvimento, há menor interesse econômico de países desenvolvidos. Portanto existe a necessidade daqueles que albergam as áreas endêmicas em estimular o avanço nas pesquisas sobre a doença.

Descrever uma série de casos da forma mucosa é importante por se tratar de uma apresentação menos freqüente que a forma cutânea, mas que nem por isso deixam de causar grandes prejuízos estéticos e funcionais aos pacientes.

Buscar dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes permite entender a distribuição dos casos da doença, sobretudo das regiões dos casos atendidos no Hospital Universitário de Brasília (HuB).

Além disso, o estudo das alterações tissulares e os tipos celulares predominantes nas lesões pode ser um dos caminhos para explicar as variadas apresentações clínicas, mesmo quando se trata de mesma espécie do parasita. Aliado à visão dos mecanismos imunopatológicos, na interação parasita-hospedeiro, instiga-se desvendar o processo de definição de doença, da cura e mesmo da resposta ou insucesso ao tratamento.

Conhecer as possibilidades de padrão de reação inflamatória em biópsias das lesões mucosas pode contribuir para o diagnóstico de LTA, orientando o clínico de forma breve na conduta com o paciente. A utilização da imunofenotipagem celular, com o auxílio da imuno-histoquímica, é também outra ferramenta para ajudar a formular hipóteses para entender o processo patológico.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GERAIS

Descrever casos de pacientes com a forma mucosa da LTA, atendidos nos ambulatórios do HuB. Analisar dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, porém correlacionando com os aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os dados demográficos dos pacientes com forma mucosa da LTA que são atendidos no HuB, como sexo, idade, profissão, comorbidades, regiões de naturalidade e procedência;
- Traçar o perfil clínico dos pacientes com ênfase nos sinais e sintomas e apresentação das lesões ao exame otorrinolaringológico (ORL);
- Analisar os exames laboratoriais auxiliares no diagnóstico da LTA e em qual deles se fez identificação da *Leishmania*;
- Estabelecer as formas clínicas de apresentação dos casos;
- Estudar as biópsias em relação à distribuição dos locais em que são realizadas e classificação das alterações encontradas para estabelecer qualitativamente as classes histopatológicas dos padrões de reação tissular;
- Realizar o perfil imuno-histoquímico das biópsias com os marcadores CD45ro, CD4, CD8, CD20, CD15, CD68 e Bcl-2 e fazer a análise quantitativa da população celular;
- Relacionar o perfil imuno-histoquímico com variáveis como o tipo de classe histopatológica, contato prévio com o antimonial pentavalente, a presença de granulomas e de *Leishmania* no estudo histopatológico.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 DEFINIÇÃO DE AMOSTRA

Amostra de conveniências, não probabilística, que teve como fonte de dados casos de pacientes atendidos no ambulatório do HuB de ambos os sexos entre 2001 e 2007.

Inicialmente, foi rastreado um total de 20 casos que poderiam se tratar da forma mucosa da LTA através de pesquisa no arquivo informatizado e também no sistema de registro de biópsias/diagnósticos do Laboratório de Anatomia Patológica do HuB. Foi feito o levantamento de lâmina, bloco e laudo impresso de todos os casos, com posterior revisão de prontuário.

Na descrição dos casos foram observados: nome (sigla), idade, naturalidade, procedência, profissão, tipo e localização da lesão, dados clínicos (sinais, sintomas, histórico de tratamentos e de lesões), tempo de evolução, exame ORL, métodos laboratoriais de diagnóstico (intradermorreação de Montenegro, imunofluorescência indireta, cultura, inoculação em *hamster* e esfregaço), comorbidades, tratamento e evolução clínica. Esses dados estão resumidos na Tabela 07, em anexo.

Para diagnóstico laboratorial da forma mucosa da LTA são empregados métodos histopatológicos, parasitológicos, imunológicos e de biologia molecular. Nos métodos histopatológicos e parasitológicos o diagnóstico de certeza é feito quando há visualização do parasita. Através de meios imunológicos, a intradermorreação de Montenegro (IRM) é positiva em 95% dos casos da forma mucosa, mas pode ser negativa principalmente em casos de pacientes imunodeprimidos. A IRM é negativa quando há ausência de qualquer sinal no local de inoculação ou com pápula menor que 5mm de diâmetro; a positividade ocorrer quando a pápula é maior ou igual a 5mm (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Já a imunofluorescência indireta (IFA) tem alta sensibilidade, mas existe a possibilidade de reação cruzada com outras doenças como Chagas, paracoccidiodomicose, pênfigo e a forma visceral da Leishmaniose. As

técnicas moleculares de PCR são de alta sensibilidade e especificidade, mas ainda de baixa acessibilidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

6.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

A amostra estudada compreende biópsias de pacientes de ambos os sexos atendidos no ambulatório do HuB com a forma mucosa da LTA. Para inclusão dos casos neste estudo existiu a ocorrência de pelo menos um dos seguintes critérios:

- a) Identificação da *Leishmania* na histopatologia, esfregaço, cultura e/ou inoculação em *hamster*;
- b) IRM reator e/ou IFA reagente com histopatologia compatível e início de tratamento para LTA;
- c) Forma cutânea pregressa de LTA tratada ou não com lesão mucosa ativa.

6.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos casos de pacientes:

- a) sem identificação de *Leishmania*, por métodos histopatológicos e/ou parasitológicos. Mesmo os pacientes com IRM e/ou IFA suspeito para LTA, mas sem início de tratamento pelo médico assistente.
- b) com comorbidades, sem identificação de *Leishmania*, por métodos histopatológicos e/ou parasitológicos, mesmo com IRM e/ou IFA suspeito para LTA, mas sem tratamento clínico. Isso por existir a possibilidade de dúvida no diagnóstico ou tratar-se de possível reação cruzada.
- c) com material insuficiente para novos cortes e realização das reações imuno-histoquímicas.

6.4 MATERIAIS

Foram encontrados 20 possíveis casos para o estudo. Destes selecionados, foram excluídos dois casos sem tratamento e com pesquisa de *Leishmania* negativa em métodos histopatológicos e parasitológicos.

O primeiro é o caso da biópsia 5049/06: paciente apresentou IRM fraca (7x6mm) e IFA de 1/40, mas não tem relato de tratamento, provavelmente por falta de seguimento. O segundo caso, 1563/07, apesar da IRM ter um padrão de reação forte (20x17mm) e IFA de 1/80, o paciente tem como comorbidade a Hanseníase (forma virchowviana) e sem relato de início de tratamento no prontuário.

Finalmente, foram incluídas dezoito biópsias para análise histopatológica.

Nos recortes para as reações imuno-histoquímicas, duas biópsias (5149/05 e 241/07) não tiveram material suficiente para as reações e foram incluídas somente na análise histopatológica.

6.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os casos foram analisados em microscopia óptica de cortes histológicos de 4µm corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). Foram realizadas as colorações histoquímicas de PAS (ácido periódico de Schiff) com diastase e Fite-Faraco para descartar a presença de fungos e bacilos álcool ácido resistentes. A análise histopatológica foi feita seguindo os critérios modificados utilizados por MAGALHÃES (1997) – Tabela 05 e 06, em anexo.

A análise qualitativa das alterações histopatológicas compreende o total de onze critérios: alterações epiteliais hiperplásicas, alterações epiteliais inflamatórias, infiltrado celular global, células mononucleares, macrófagos vacuolizados, células epitelíoides, granuloma, plasmócitos, necrose aguda e/ou subaguda, fibrose e a presença do parasita.

6.6 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Na análise quantitativa da expressão imuno-histoquímica dos marcadores celulares, para cada caso e cada marcador, a lâmina foi fotografada com auxílio do programa WinTV2000K Versão 4.7.23045 (1998-2004) em dois campos aleatórios de 400x com maior positividade celular (*hot spot*) e distante das áreas de ulceração, com capturador de imagens em uma

área correspondente a $0,0432\text{mm}^2$ cada campo (Figura 20, em anexo). As duas fotos foram armazenadas para cada caso e cada marcador.

Utilizando o programa UnBVision (HORITA, 2001), foi carregada uma foto por vez e com auxílio do cursor foram contadas manualmente as células positivas coradas em castanho (Figura 21, em anexo). Esses dois valores foram somados, correspondendo ao número de células em duas fotos, ou seja, $2 \times 0,0432\text{mm}^2$. Converteu-se esse valor para uma área padrão de 1mm^2 para expressar o número de células positivas conforme Tabela em anexo para a análise comparativa dos casos.

6.6.1 Técnica das reações

A técnica de imuno-histoquímica utilizou o Kit Estreptavidina Peroxidase, e os seguintes anticorpos (Tabela 11, em anexo) da Dako Cytomation e Neomarkers:

- M x H CD45ro (célula T), da Dako, código M-0742, clone UCHL1.
- M x H CD20CY (célula B), da Dako, código M – 0755, clone L26.
- M x H CD8 (célula T), da Dako, código M-7103, clone C8/144B.
- M x H CD68 (macrófago), da Dako, código M-0876, clone PG-MI.
- M x H CD4 AB-2 (célula T), da Neomarkers, código MS392S, clone 1F6.
- M x H CD15 (neutrófilos), da Dako, código M – 0733, clone C3D-1.
- M x Bcl-2 oncoproteína da Dako, código M0887, clone 124.

Os procedimentos técnicos para a utilização desses anticorpos foram divididos em várias etapas, conforme se segue abaixo:

a. Hidratação das lâminas – após cortes dos blocos de parafina, as secções foram desparafinizadas em 2 (dois) banhos de equivalente vegetal

biodegradável do xilol (ECO-K – Clarus Technology) em estufa a 37°C durante 15 minutos e à temperatura ambiente também durante 15 minutos. Em seguida, foram hidratadas em 4 (quatro) banhos de álcool (álcool absoluto, álcool a 95%, 90% e 80%) e submetidas diretamente ao bloqueio de Peroxidase Endógena;

b. Bloqueio da Peroxidase Endógena – as secções foram submetidas a 3 banhos de 10 minutos cada um em solução de água oxigenada a 3% (equivalente à água oxigenada de 10 volumes), sendo as soluções trocadas a cada banho e obtidas à maneira da água oxigenada (mais ou menos 51ml de peróxido de hidrogênio a 3% e 460ml de água destilada);

c. Pré-tratamento das lâminas – as lâminas foram distribuídas em suportes plásticos e colocadas no vaporizador (Steamer - marca T-Fal) e imersas em solução de tampão citrato pH 6 ou tampão EDTA pH 8 (de acordo com a exigência requerida pelo tipo de anticorpo primário utilizado) a 97°C, durante 30 minutos. Todas foram pré-tratadas com solução tampão citrato pH 6, exceto CD-4 em que foi utilizado o tampão EDTA pH 8, para que, em seguida, fosse retirado o vaporizador. Porém, dentro da solução utilizada, as secções foram esfriadas por um período de aproximadamente 15 minutos;

d. Preparo de tampão:

- Tampão de Citrato 10mM pH 6 (ácido cítrico monohidratado – 2,1g e água destilada – 1.000ml).
- Tampão de EDTA 10mM pH 8 – (Etioleno diaminotetraacetato de sódio (EDTA) – 1,86g, água destilada – 5.000 ml e NaOH 2N – 2 a 2,5 ml ajustado pH com Na OH ou HCl 1N).
- Tampão TRIS 0,05 mM pH 7,6 (Solução TBS) (Trizma Base - Sigma Cod. T-1503 - 6.1g e água destilada – 1.000 ml);

e. Reagentes primários – as lâminas distribuídas sobre espumas de borracha, umedecidas com água. Posteriormente, foram acondicionadas em cubas plásticas com tampas, foram lavadas com TBS e secadas com lenço de

papel. Retirado o excesso de Tampão TBS, os Reagentes Primários, previamente diluídos, foram gotejados para que, em seguida, as lâminas serem deixadas na geladeira por toda a noite.

f. Reagentes secundários (Kit Dako K – 0690 – LSAB+) – cada lâmina foi lavada com TBS e o excesso de tampão TBS foi cuidadosamente retirado com lenço de papel, para que, em seguida, ser gotejado o reagente secundário (indicado no Kit LSAB+). Foi recoberta toda a secção, sendo incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente;

g. Reagente Streptavidina Peroxidase (Kit Dako K-0690) – cada lâmina foi lavada com TBS cujo excesso foi retirado com lenço de papel para que, em seguida, ser gotejado o reagente Streptavidina Peroxidase (indicado no Kit ISAB+), recobrimo toda a secção, por um período de 30 minutos à temperatura ambiente.

h. Preparo de solução de DAB líquido (K-3466) – 3'3' Diaminobenzidina (DAB) – 1 gota de tampão que acompanha o kit DAB líquido homogeneizado – 1ml;

i. Solução DAB – cada lâmina foi lavada com TBS, cujo excesso foi retirado delas com lenço de papel, cuidadosamente. Depois de gotejada a solução DAB, o suficiente para cobrir toda a secção, foi incubada por 10 minutos.

j. Coloração (Hematoxilina) – as lâminas foram lavadas com água corrente, depois colocadas na cuba para coloração com Hematoxilina de Harris durante 20 segundos. Em seguida, foram lavadas com água amoniacal e novamente com água corrente;

k. Montagem das lâminas – para montagem, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com resina sintética (Entellan), sendo que em todas as etapas as lâminas jamais foram secadas;

I. Leitura das lâminas – as lâminas preparadas foram examinadas sob microscopia de luz, obedecendo aos critérios de análise de todos os campos microscópicos com objetivas de pequeno, médio e grande aumento. Na contagem de células marcadas, utilizou-se o método de semi-quantificação dos resultados da imuno-histoquímica.

6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os achados demográficos, clínicos, laboratoriais e histopatológicos foram analisados do ponto de vista descritivo. Enquanto nas classes histopatológicas e nos achados imuno-histoquímicos foram aplicados testes não paramétricos, além de uma análise descritiva.

De início, os valores obtidos de cada variável contínua foram descritos através da média e do desvio padrão (Tabela 10, em anexo).

Devido ao número pequeno de amostras, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon para analisar os marcadores e as classes por serem grupos pareados, ou seja, os marcadores são dependentes dentro de cada caso e são mensurados em cortes histológicos semelhantes.

Relacionando os achados histopatológicos (granuloma e parasitas) e o contato prévio com antimonial pentavalente com os resultados do perfil imuno-histoquímico, utilizou-se o teste de Mann Whitney U, um teste não paramétrico para analisar grupos não pareados.

Para todos os testes adotou-se o valor de significância estatística menor a 5% ($p < 0,05$).

7 RESULTADOS

7.1 RESULTADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Dos pacientes do estudo (Gráfico 01), quatorze são do sexo masculino (77,78%) e quatro do sexo feminino (22,22%), com idade variando de 11 a 75 anos. As profissões (Gráfico 02) foram variadas com maior frequência da atividade de lavrador (33,33%), sendo todos esses do sexo masculino.

A distribuição geográfica regional dos casos está representada na Figura 06. A naturalidade é de maioria do estado de Goiás (27,78%), seguido de Minas Gerais e Bahia (16,67% cada), Tocantins e Distrito Federal (11,11% cada) e ainda do Maranhão, Piauí e Mato Grosso (5,56% cada). Já a procedência se concentra em quatro regiões: Distrito Federal (55,56%), Goiás (27,78%), Tocantins(11,11%) e Minas Gerais (5,56%).

Os dados clínicos dos pacientes foram analisados sumariamente (Gráfico 03). Todos os casos (Gráfico 03A) tiveram comprometimento da mucosa nasal, seguida pelo palato mole e duro, mucosa labial e também da laringe; dois pacientes apresentavam lesão de pele ativa concomitante com a lesão de mucosa. Em relação aos sinais e sintomas (Gráfico 03B) que foram referidos durante as consultas, a obstrução nasal foi a queixa mais frequente (25%), além de disfagia e rinorréia (13,46% cada).

A apresentação das lesões ao exame ORL está representada no Gráfico 04. A lesão infiltrada com ulceração e perfuração do septo nasal foi a mais comumente encontrada (61,11%), seguida das lesões infiltradas com ou sem ulceração (16,67% cada) e infiltrada com erosão (5,56%). Analisando os prontuários, as formas clínicas (Gráfico 05) da LTA mucosa encontradas foram: indeterminada (44,44%), tardia (38,89%), e concomitante (16,67%); não se verificou a forma primária e contígua.

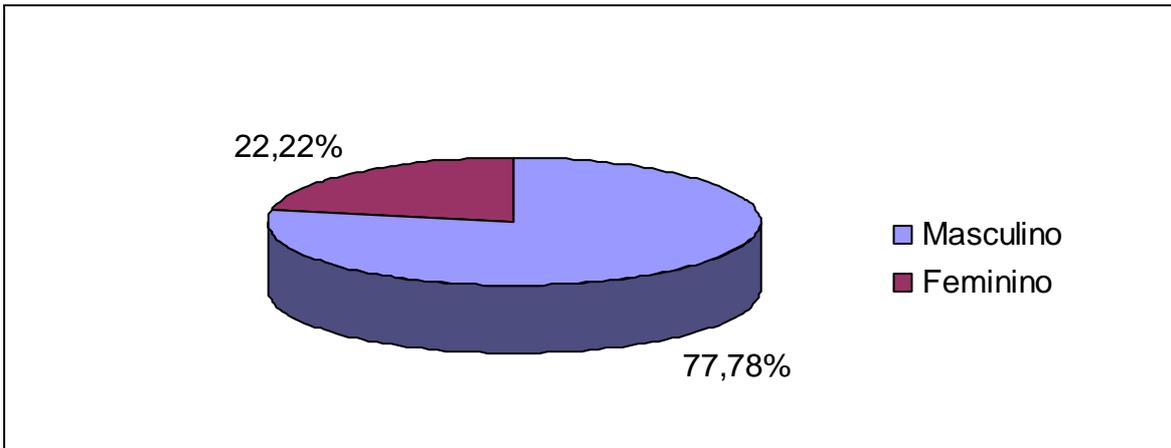


Gráfico 01 - Distribuição dos casos em relação ao sexo.

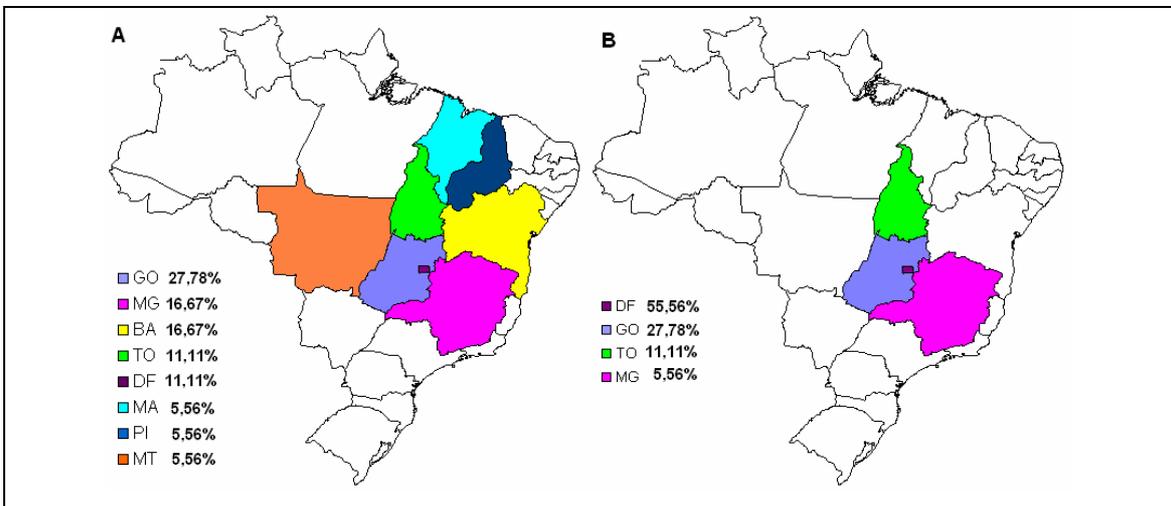


Figura 06 - Distribuição casos em relação à região de naturalidade (A) e procedência (B) dos pacientes.

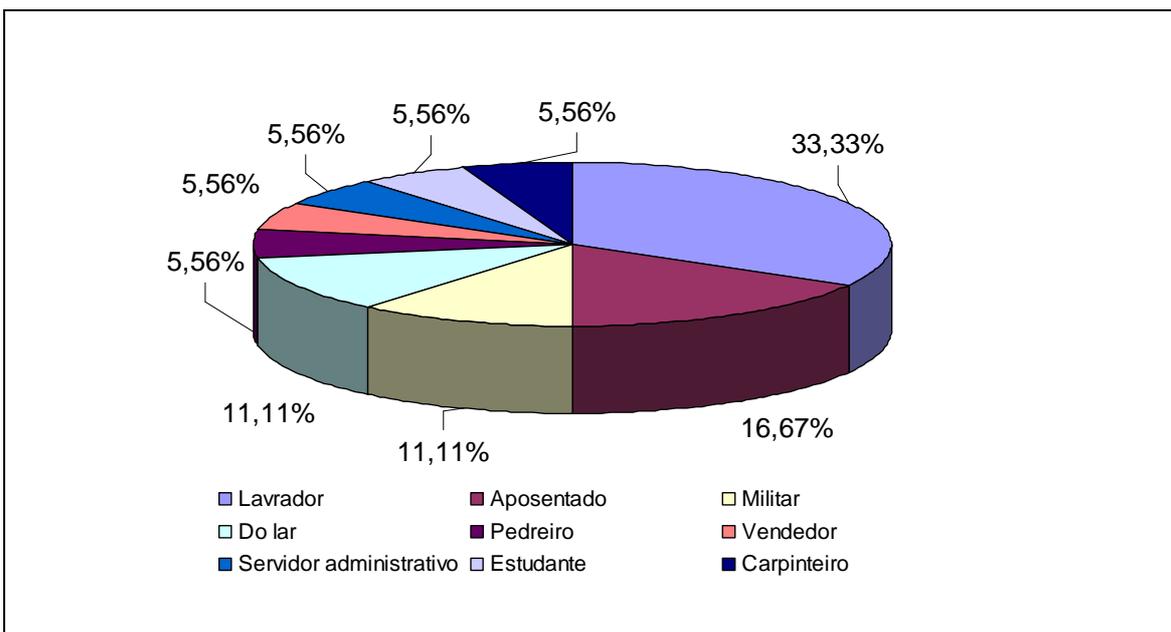


Gráfico 02 - Distribuição dos casos em relação às profissões dos pacientes.

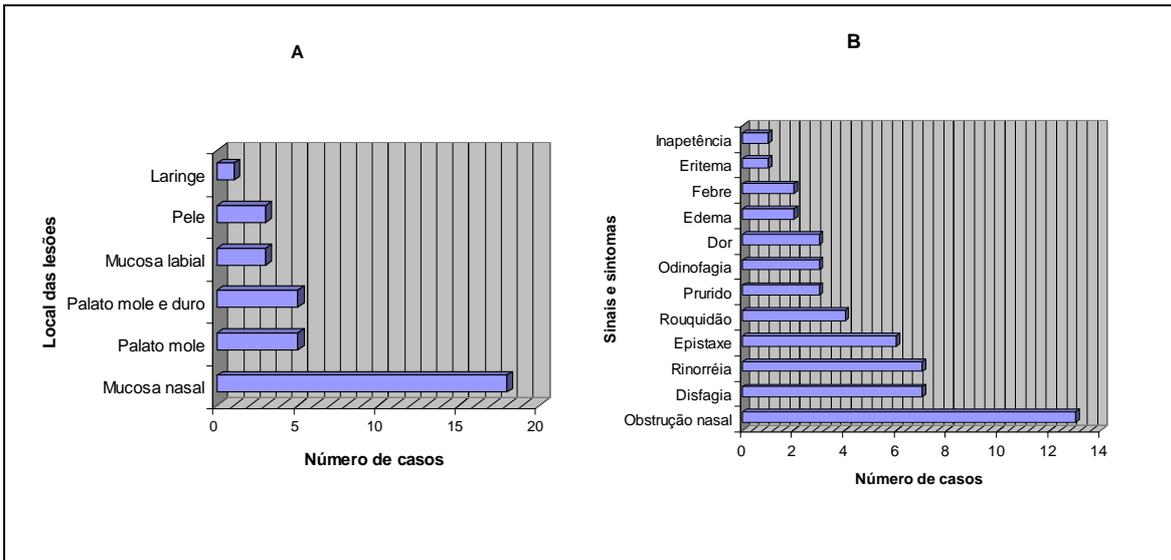


Gráfico 03 - Distribuição dos casos em relação ao local das lesões (A) e aos sinais e sintomas (B) dos pacientes.

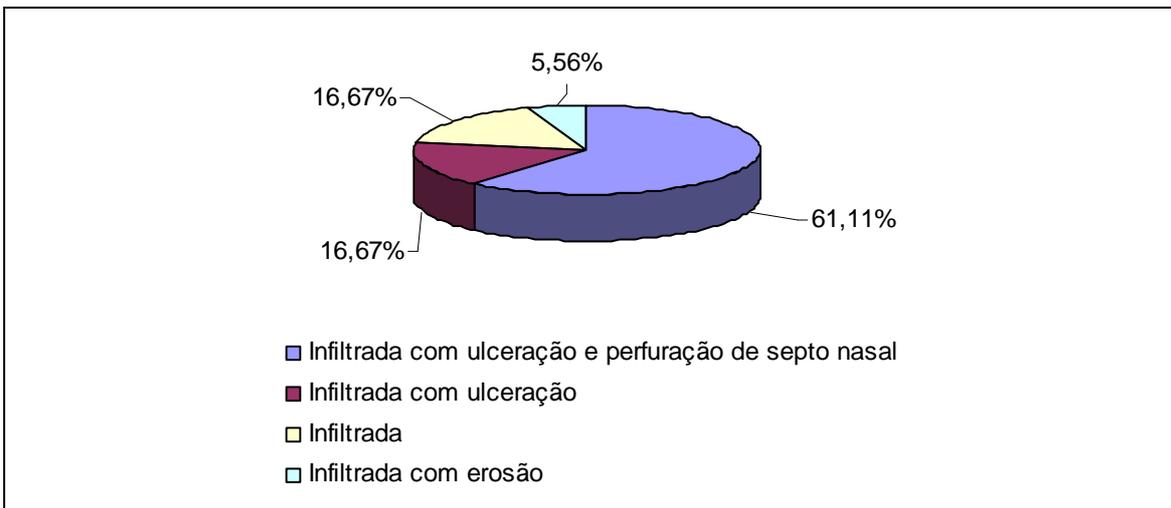


Gráfico 04 - Distribuição dos casos em relação ao tipo de lesão ao exame otorrinolaringológico.

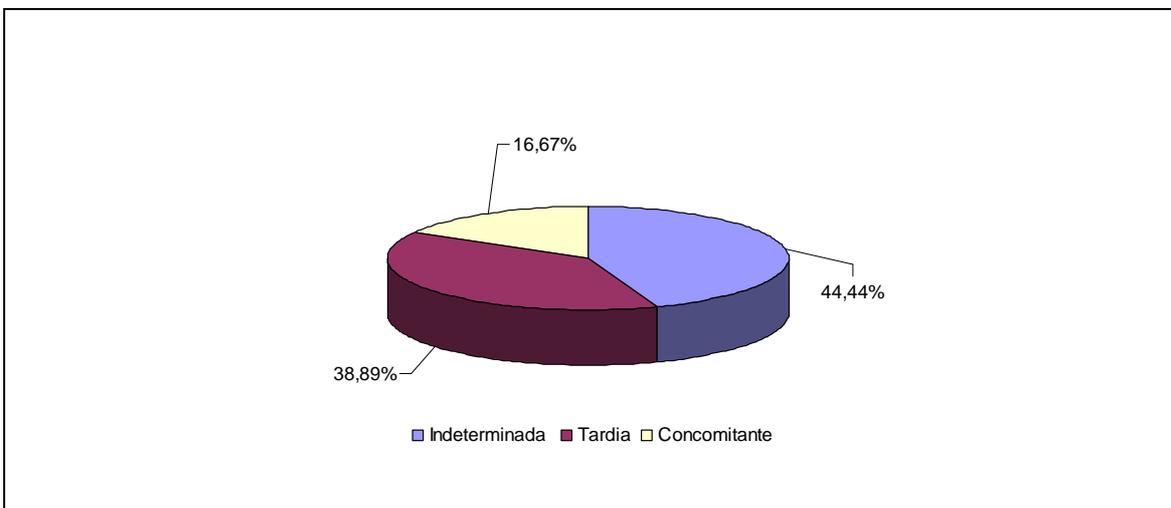


Gráfico 05 - Distribuição dos casos em relação à forma clínica dos casos.

As comorbidades (Gráfico 06) dos casos foram diversas, ocorrendo desde doenças infecciosas e parasitárias, como Chagas e Malária, até outras como Diabetes Mellitus e Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS).

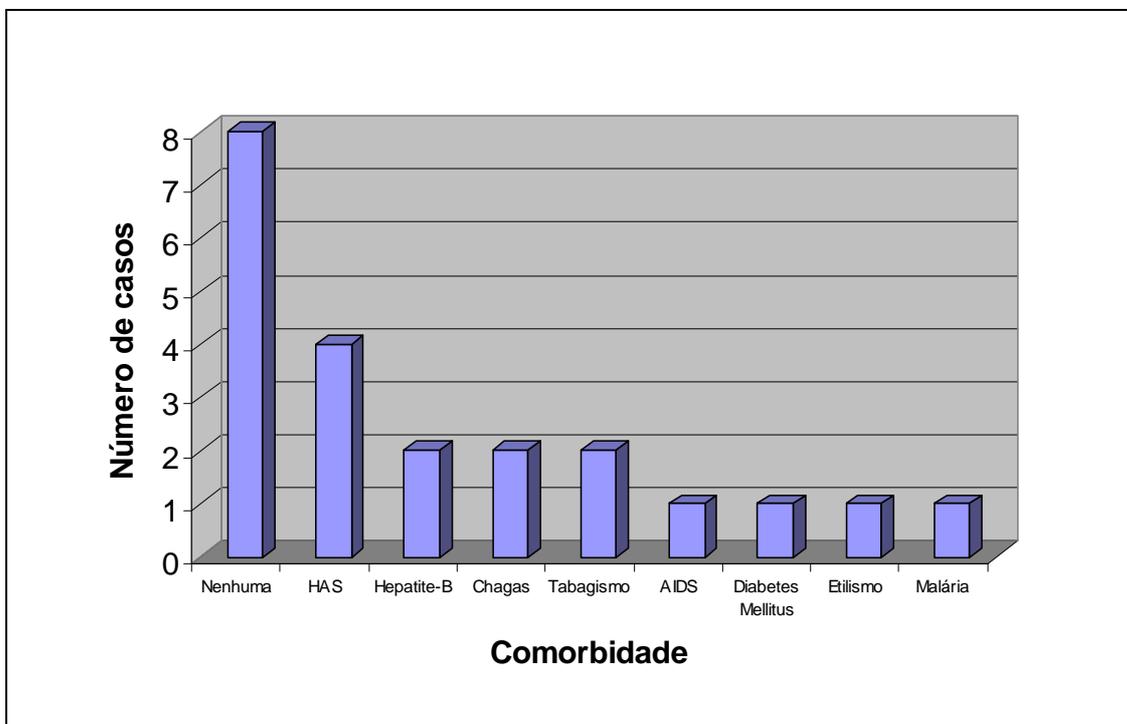


Gráfico 06 - Distribuição dos casos em relação às comorbidades dos casos. (Legenda: AIDS= Síndrome da Imunodeficiência Adquirida; HAS= Hipertensão Arterial Sistêmica).

7.2 RESULTADOS DOS EXAMES COMPLEMENTARES

Os exames laboratoriais complementares realizados foram a IRM, IFA, cultura, esfregaços e inoculação em *hamster*, mas nem sempre em todos os casos.

A IRM foi realizada em dezesseis pacientes sendo positivo (maior que 5mm) em todos eles, com uma das dimensões variando de 7 a 38mm.

Os resultados da primeira IFA foram analisados (Gráfico 07), no estudo. Em 12 dos 16 pacientes em que ela foi encontrada, a titulação variou de 1/20 a 1/320, sendo que a titulação 1/80 a mais freqüente (7 casos). Em dois casos não foram encontrados dados referentes à primeira IFA.

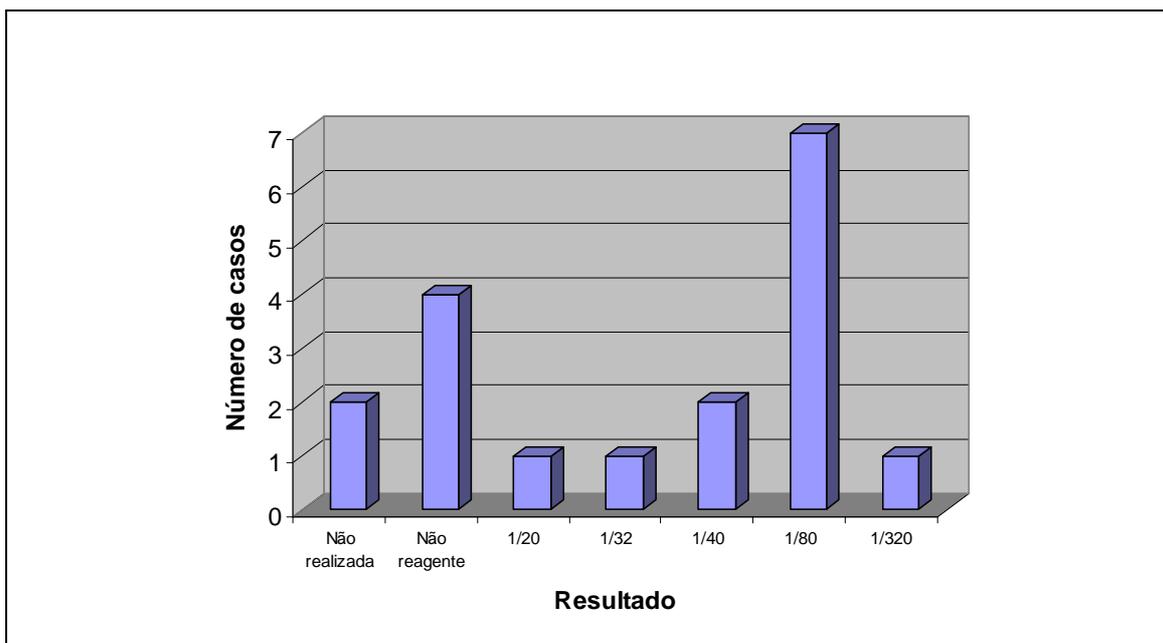


Gráfico 07 - Distribuição dos casos em relação ao resultado da primeira IFA (imunofluorescência indireta).

A inoculação em *hamster* foi aplicada em 4 casos, mas em nenhum deles foi identificado *Leishmania* por esse método. Desses 4 casos, 3 tiveram demonstração do parasita pelo esfregaço. No outro caso, foi negativa a pesquisa do parasita pelos dois outros métodos: esfregaço e cultura. Em um caso em que a cultura foi positiva para *Leishmania* não foram realizados esfregaços e nem inoculação para comparar estes métodos.

7.3 RESULTADOS DO ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

As biópsias dos pacientes foram realizadas principalmente na mucosa nasal (55,56%) e no palato mole (33,33%), além dos lábios (5,56%) – Gráfico 08.

Os padrões de reação tissular encontrados estão expostos na Tabelas 08, em anexo, com os índices distribuídos por critérios.

As alterações epiteliais incluem as hiperplásicas (AEH) e inflamatórias (AEI) e todos os casos tiveram algum índice de alteração nesses critérios (Gráfico 09). Alguns exemplos dessas alterações estão nas Figuras 07, 08 e 09.

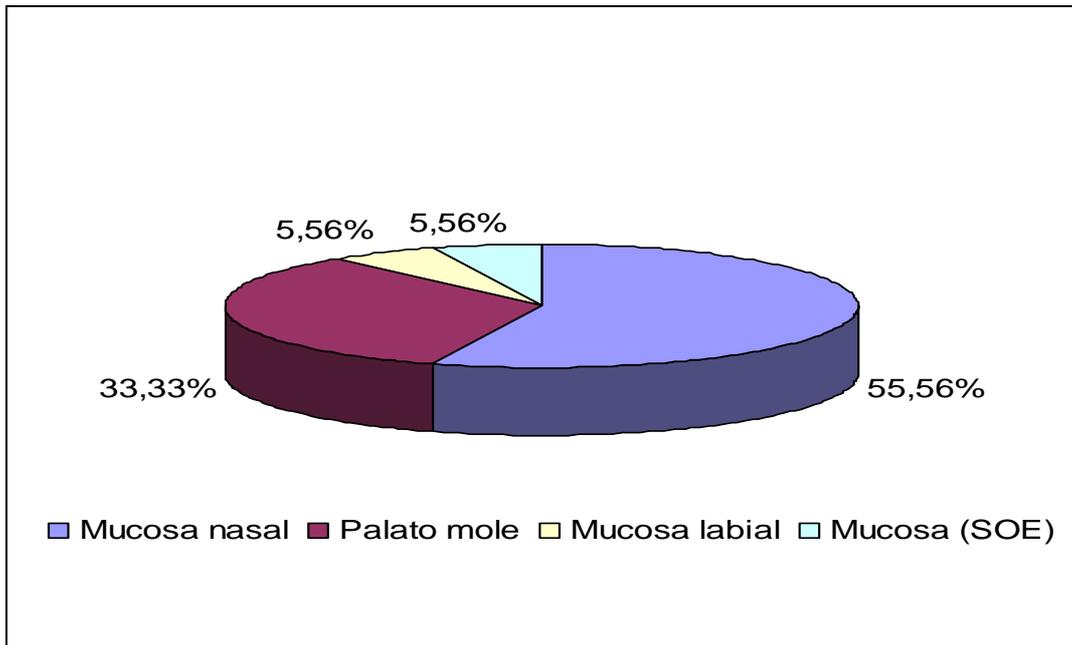


Gráfico 08 - Distribuição dos casos em relação ao local de obtenção das biópsias.

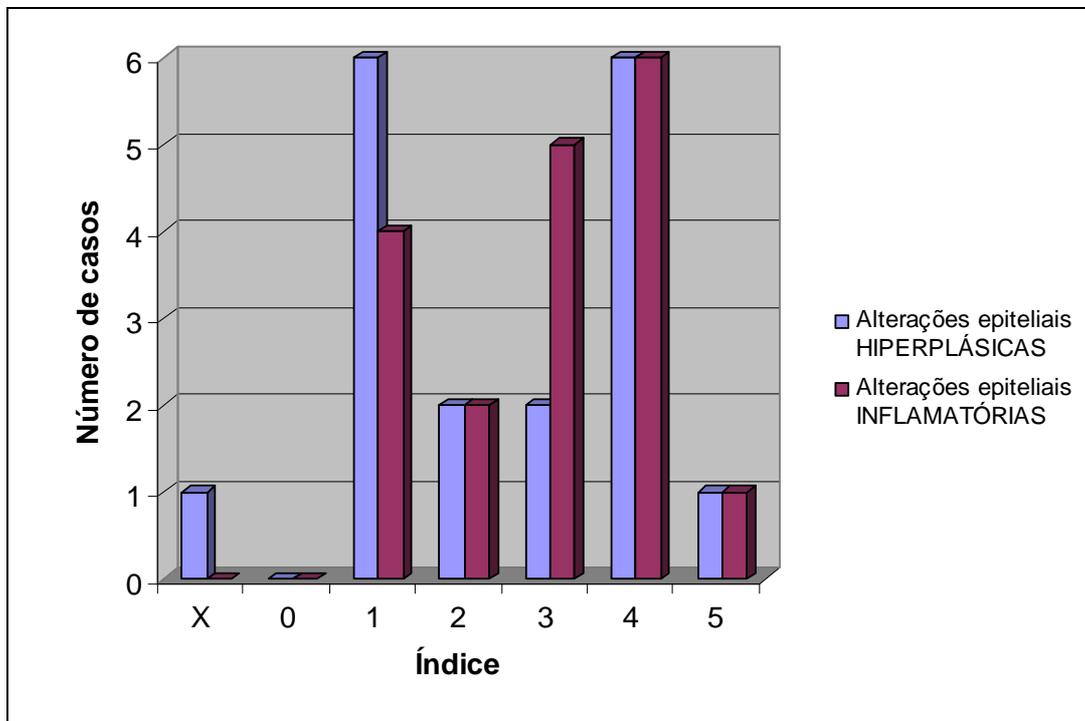


Gráfico 09 - Distribuição dos casos em relação às alterações histopatológicas epiteliais dos casos. (Legenda: X= não aplicável).

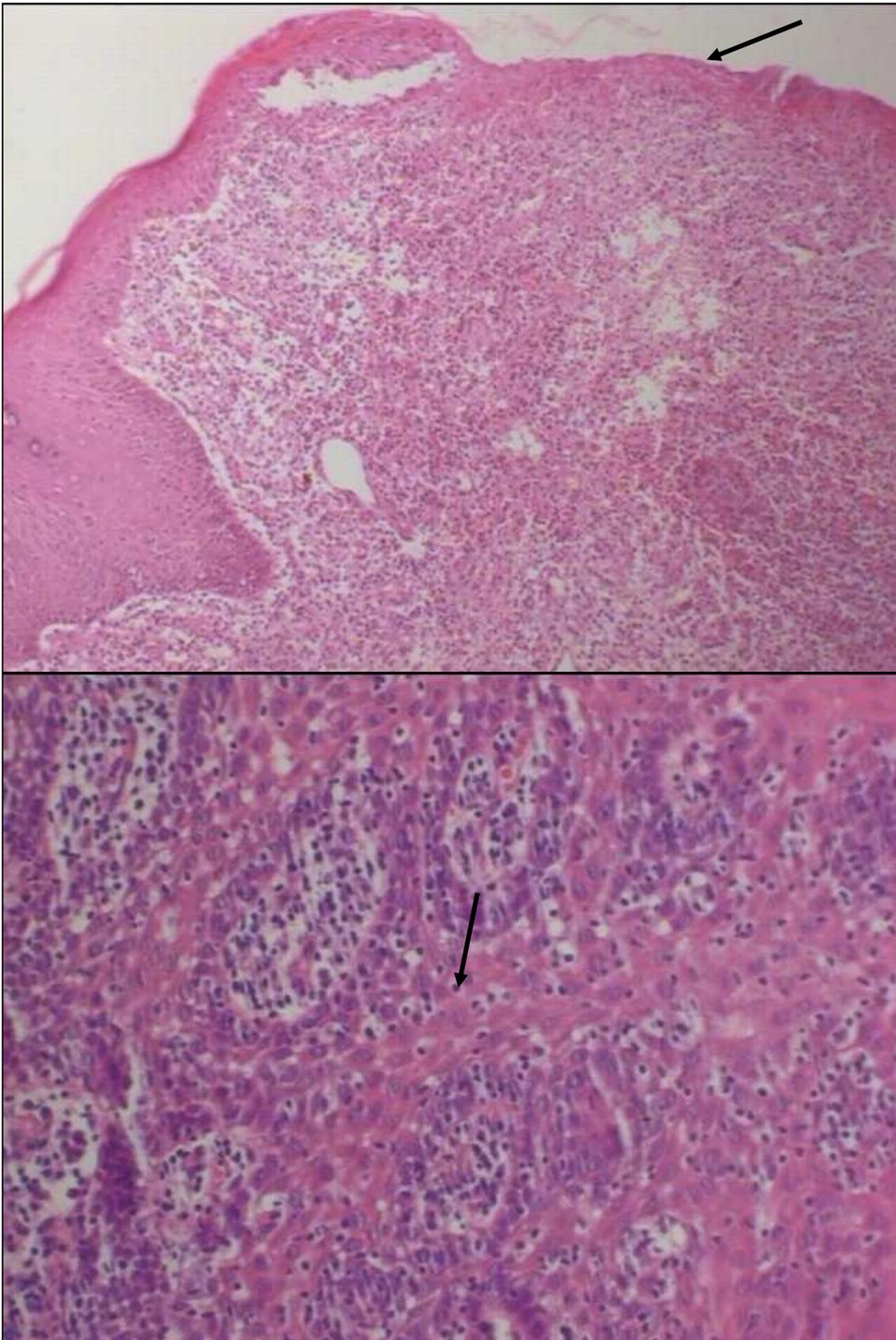


Figura 07 - Fotomicrografias de alterações epiteliais hiperplásica e inflamatória. Acima (caso 2 – HE, 100x), hiperplasia discreta com alongamento do cone epitelial (AEH=1) com área de ulceração (AEI=4 - seta). Abaixo (caso 16– HE, 100x), papilomatose acentuada (AEH=2) com fusão do cones epiteliais, além de espongiose e linfócitos intra-epiteliais (seta). (Legenda: AEH= alteração epitelial hiperplásica; AEI= alteração epitelial inflamatória).

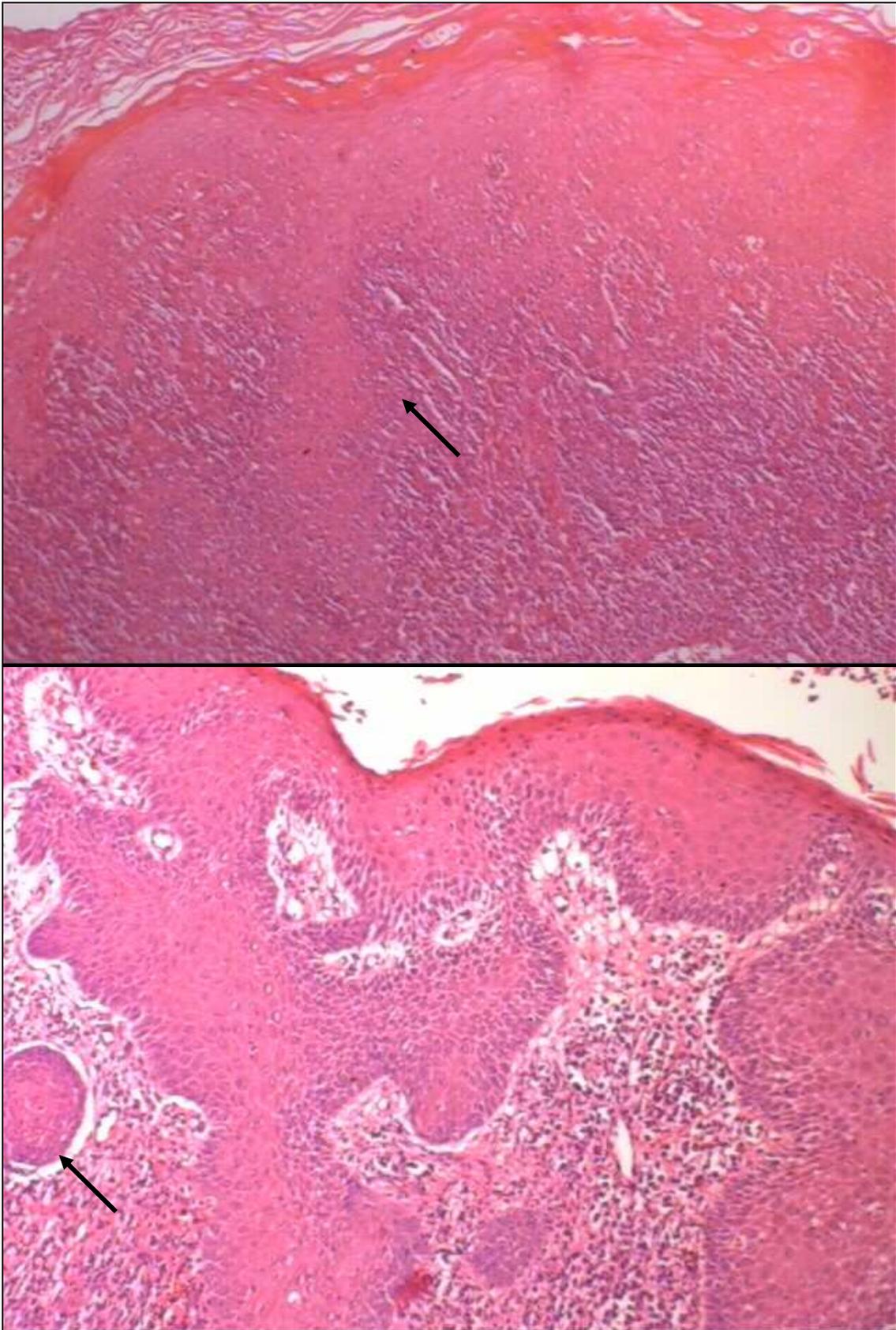


Figura 08 - Fotomicrografias de alterações epiteliais hiperplásicas. Acima (caso 7 – HE, 100x), hiperplasia pseudoepiteliomatosa grau 1 (AEH=3) e, abaixo (caso 14 – HE, 100x), grau 2 (AEH=4): formação de blocos celulares epiteliais (setas). (Legenda: AEH= alteração epitelial hiperplásica).

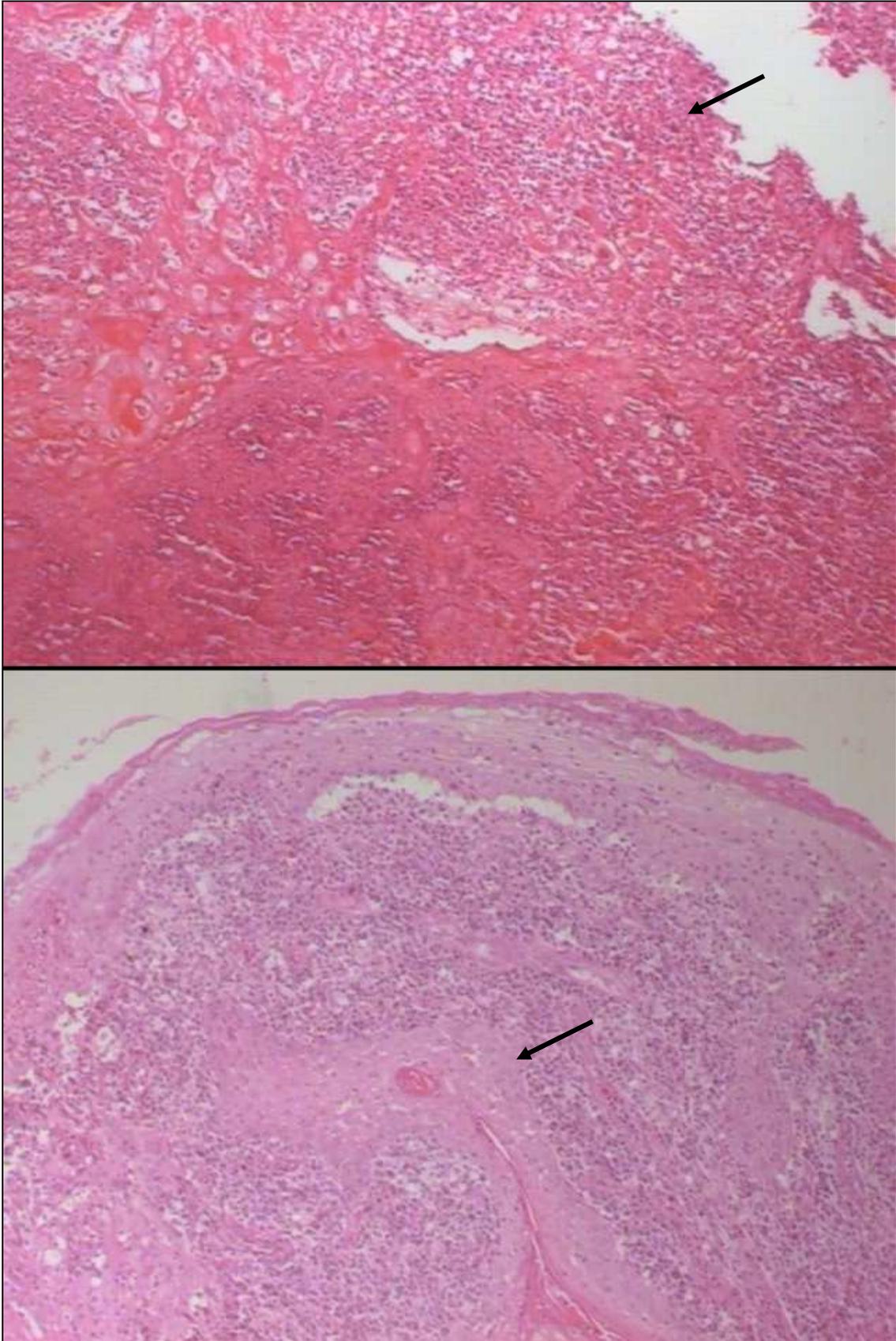


Figura 09 - Fotomicrografias de alterações epiteliais inflamatória e hiperplásica. Acima (caso 7 – HE, 100x), área de erosão (AEI=3) com depósito de material fibrinoleucocitário e “debris” celulares (seta). Abaixo (caso 9 – HE, 100x), hiperplasia pseudoepiteliomatosa grau 3 (AEH=5): formação de blocos celulares epiteliais amplos e irregulares (seta). (Legenda: AEH= alteração epitelial hiperplásica; AEI= alteração epitelial inflamatória).

As alterações tissulares relacionadas aos tipos celulares encontrados no córion foram enquadradas no Gráfico 10. As células mononucleares e os plasmócitos foram os tipos celulares mais encontrados em diferentes índices. O granuloma foi identificado em cinco casos, sendo que três deles foram encontradas células gigantes multinucleadas, tipo Langhans. Em nenhum dos casos foi encontrado macrófagos vacuolizados. Exemplos das alterações histopatológicas inflamatórias celulares estão na Figura 10 e 11.

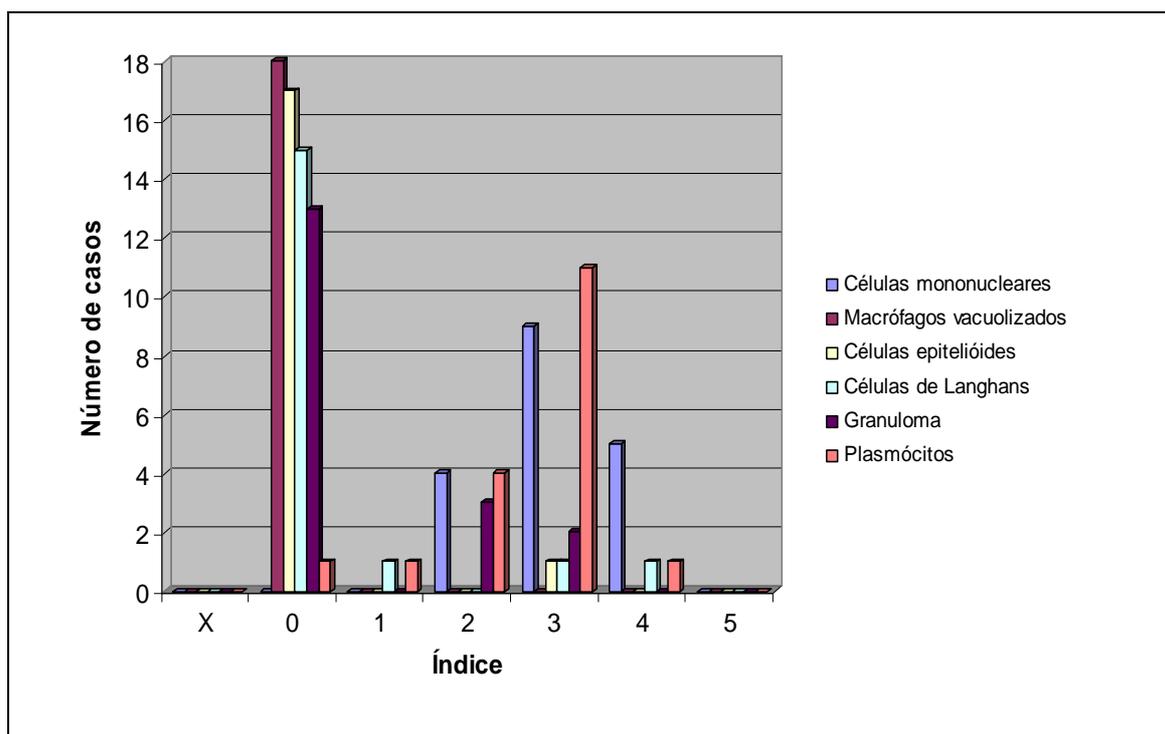


Gráfico 10 - Distribuição dos casos em relação às alterações histopatológicas do infiltrado inflamatório celular no córion. (Legenda: X= não aplicável).

As alterações tissulares adaptativas/inflamatórias (fibrose e necrose aguda/ subaguda) estão distribuídas no Gráfico 11 e exemplificadas na Figura 12. A fibrose foi a alteração mais comumente encontrada nos casos, com índice variando de 0 a 4. Ela inicia-se com formação de traves de tecido conjuntivo em direção a cicatrização da lesão com amplas áreas de colágeno e alguns vasos residuais. A necrose foi identificada no seio do infiltrado inflamatório em área com formação de uma malha delicada de fibrina que tem maior afinidade à eosina na coloração de HE.

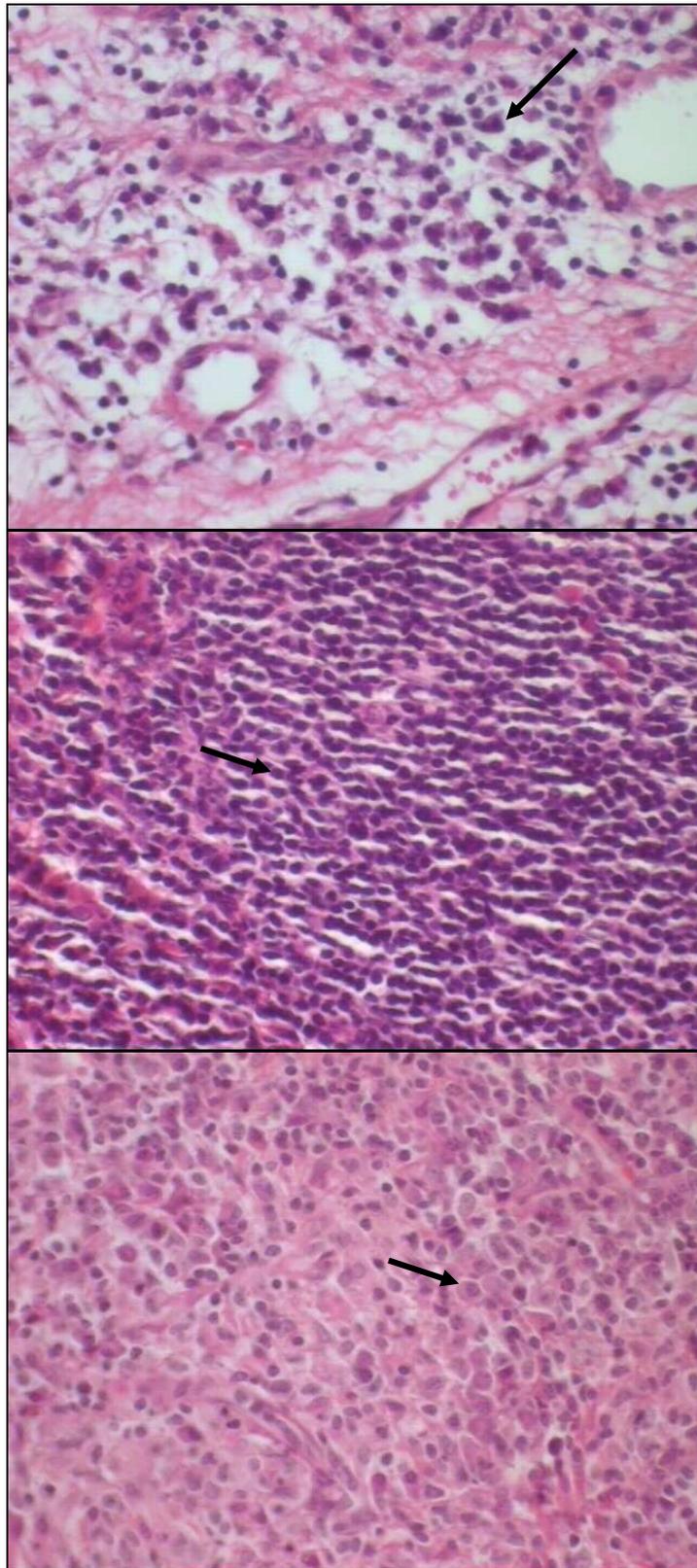


Figura 10 - Fotomicrografias de alterações histopatológicas do infiltrado inflamatório celular no córion. Acima (caso 4 – HE, 200x), infiltrado celular global discreto (ICG=2) com mononucleares (CM=2) e plasmócitos em pequenos acúmulos (seta - PLASM=2). Ao centro (caso 6 – HE, 400X), infiltrado celular global moderado (ICG=3), com predomínio de mononucleares (seta - CM=3). Abaixo (caso 3 – HE, 400x), infiltrado celular global moderado difuso (ICG=4) com mononucleares (CM=4) e plasmócitos abundantes (seta - PLASM=4). (Legenda: ICG=infiltrado celular global; PLASM= plasmócitos; CM= células mononucleares)

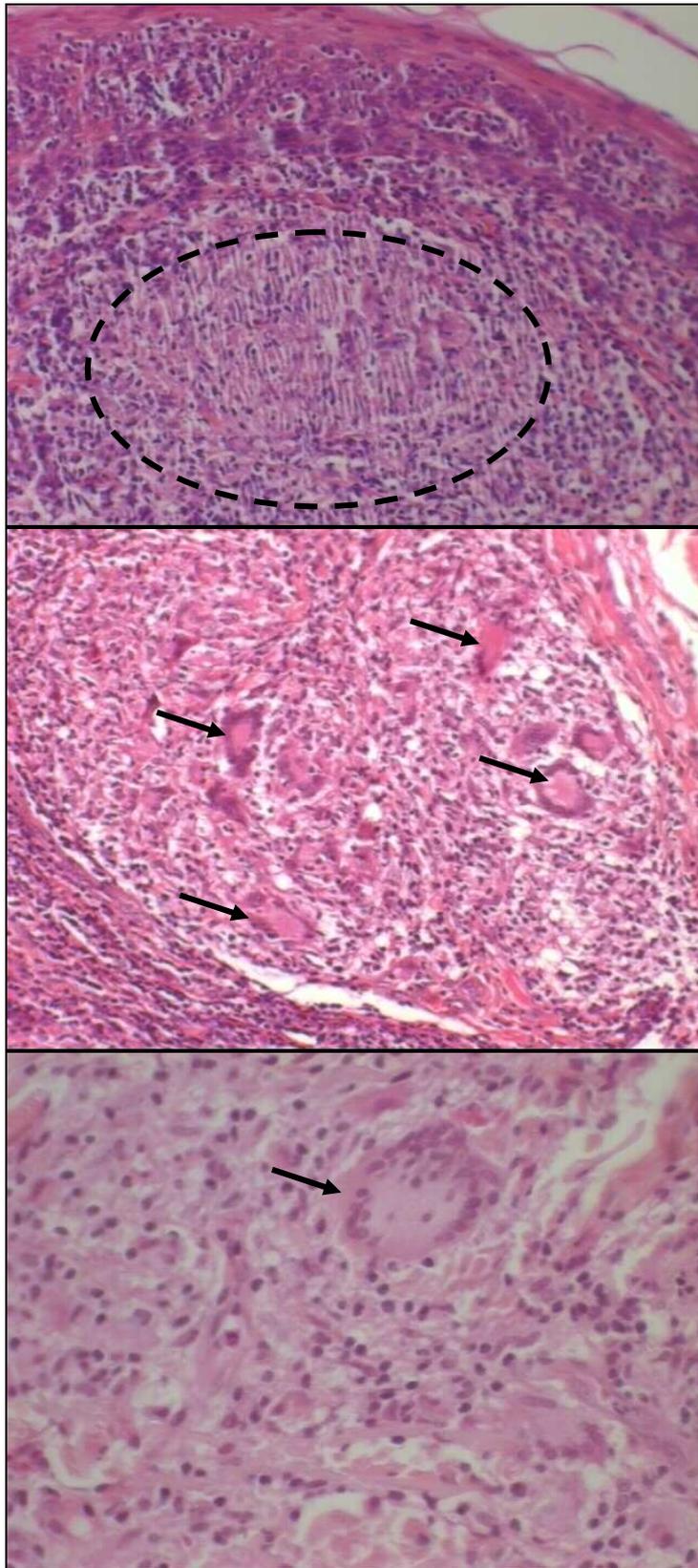


Figura 11 - Fotomicrografias de alterações histopatológicas do infiltrado inflamatório celular no córion com presença de granulomas. Acima (caso 16 – HE, 200x), esboço de granuloma (círculo tracejado - GRN=2), sem células gigantes multinucleadas (CL=0). Ao centro (caso 6 – HE, 200X), granuloma (GRN=3) com várias células gigantes (setas - CL=3). Abaixo (caso 2 – HE, 400x), detalhe de uma célula gigante, tipo Langhans (seta – CL=4). (Legenda: GRN= granuloma; CL= células de Langhans)

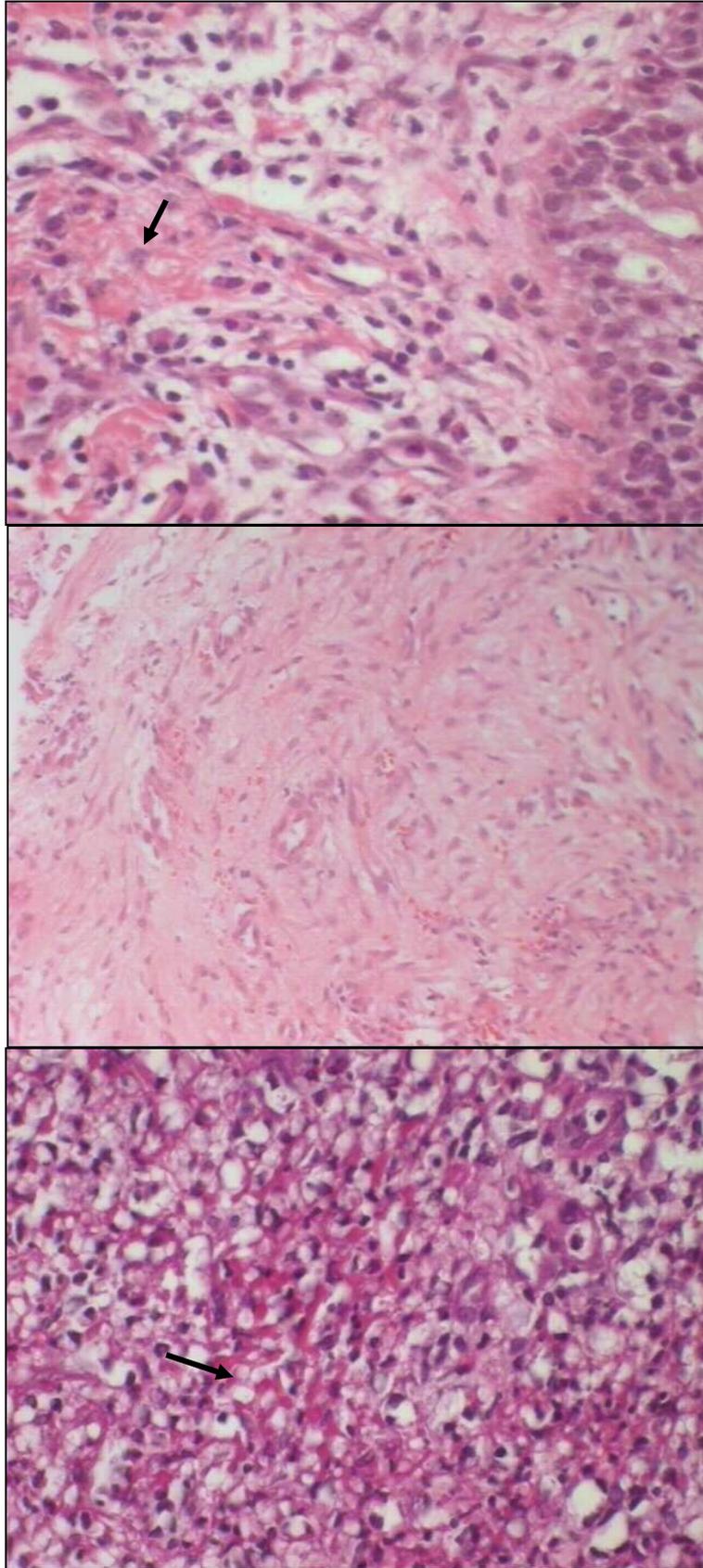


Figura 12 - Fotomicrografias de alterações tissulares inflamatórias/adaptativas. Acima (caso 4 – HE, 400x), hiperplasia discreta de fibroblastos (seta – F=1). Ao centro (caso 12 – HE, 200x), fibrose moderada em área adjacente ao infiltrado (F=4). Abaixo (caso 5 – HE, 200x), malha de fibrina em uma necrose fibrinóide focal e isolada (seta - NA=3). (Legenda: F=fibrose; NA=necrose aguda).

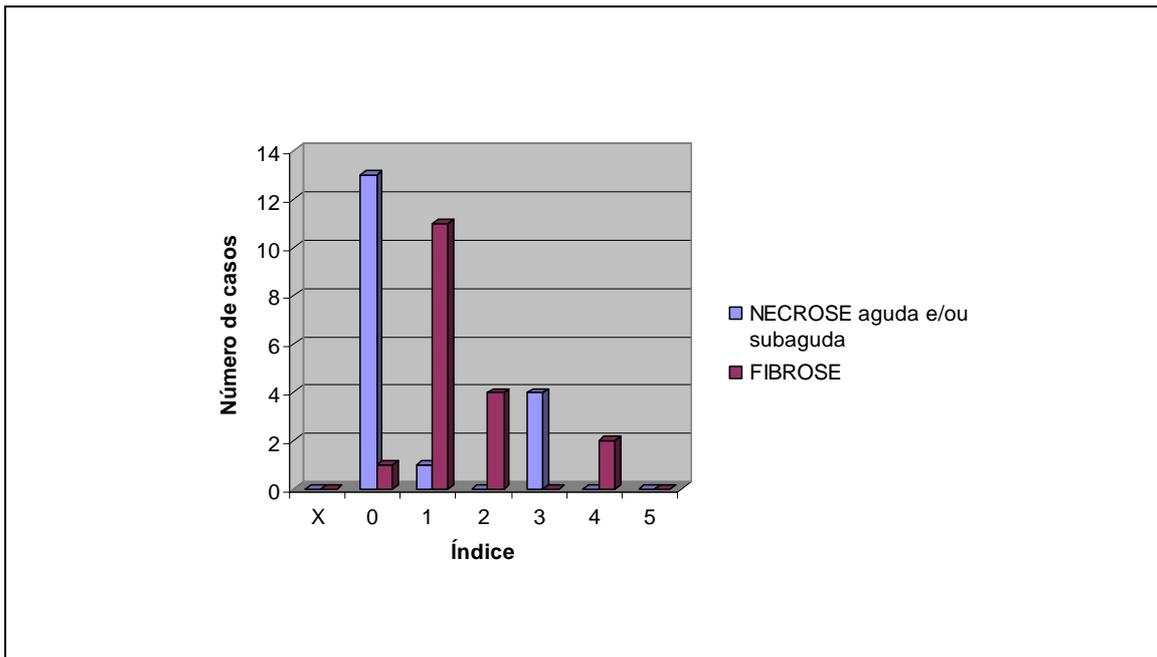


Gráfico 11 - Distribuição dos casos em relação às alterações inflamatórias/adaptativas tissulares no córion. (Legenda: X= não aplicável).

De maneira geral, a demonstração da *Leishmania* (Figura 13) foi feita em 44,44% dos casos seja através da histopatologia ou por algum método parasitológico (Gráfico 12A). Na histopatologia do estudo (Gráfico 12B), a identificação de *Leishmania* foi possível em 33,33% dos casos.

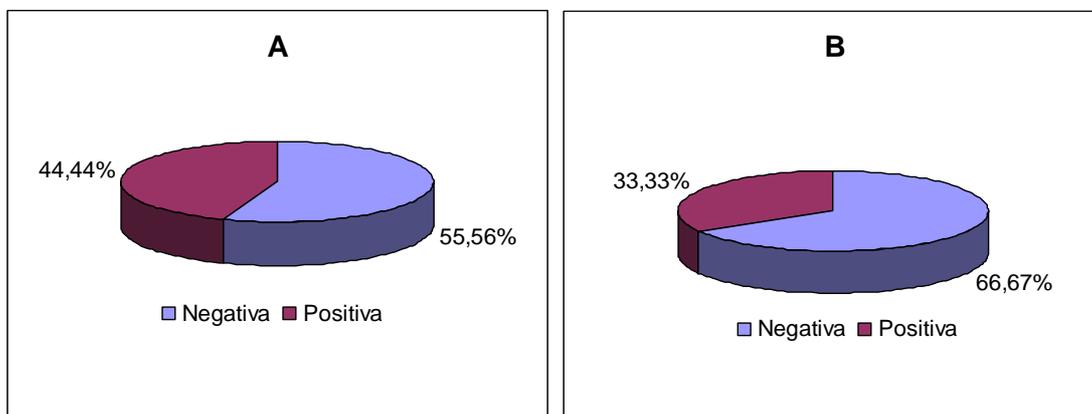


Gráfico 12 - Resultado da pesquisa de *Leishmania* por métodos parasitológicos e histopatológico (A) e somente pela histopatologia do estudo (B).

A distribuição da quantidade de parasitas dos casos está representada no Gráfico 13A. Algum método parasitológico foi aplicado em nove casos para identificação de *Leishmania* e confrontando com o resultado do estudo histopatológico destes casos percebe-se que em seis deles foi encontrado o parasita (66,66%). Desses casos em que os parasitas foram encontrados (Gráfico 13B), em três a pesquisa foi positiva no método

parasitológico, em dois em ambos os métodos e em um somente na histopatologia.

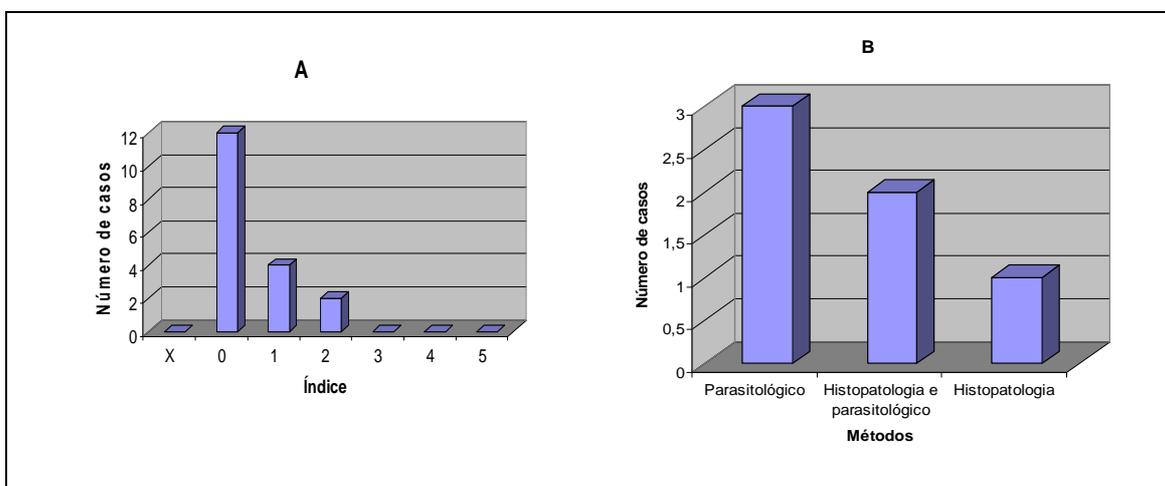


Gráfico 13 - Distribuição dos casos em relação à quantidade de parasitas (A) e aos métodos em que eles foram observados (B). (Legenda: X= não aplicável).

No Gráfico 14, está a freqüência da pesquisa de *Leishmania* por algum método parasitológico (esfregaço, cultura ou inoculação) ou histopatológico em relação contato prévio com o antimonial pentavalente no tratamento da forma cutânea para LTA. Dez pacientes tinham relato de contato prévio em tratamento da forma cutânea progressa da LTA. Desses, em sete a pesquisa para *Leishmania* foi positiva; já nos oito outros casos sem história de contato prévio com o antimonial, apenas em um se encontrou o parasita.

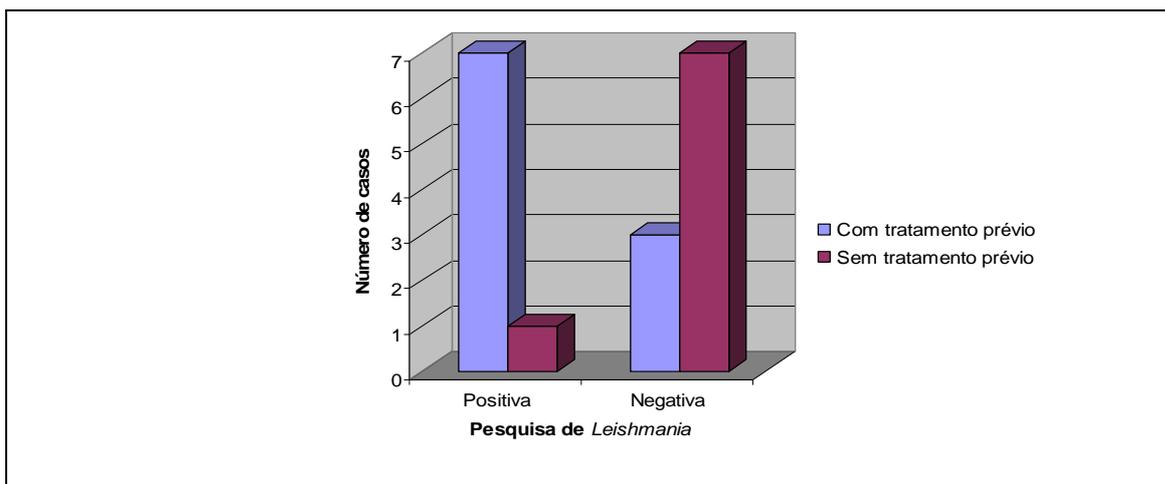


Gráfico 14 - Freqüência da presença de *Leishmania* em métodos histológico/parasitológicos em relação ao contato prévio com antimonial pentavalente.

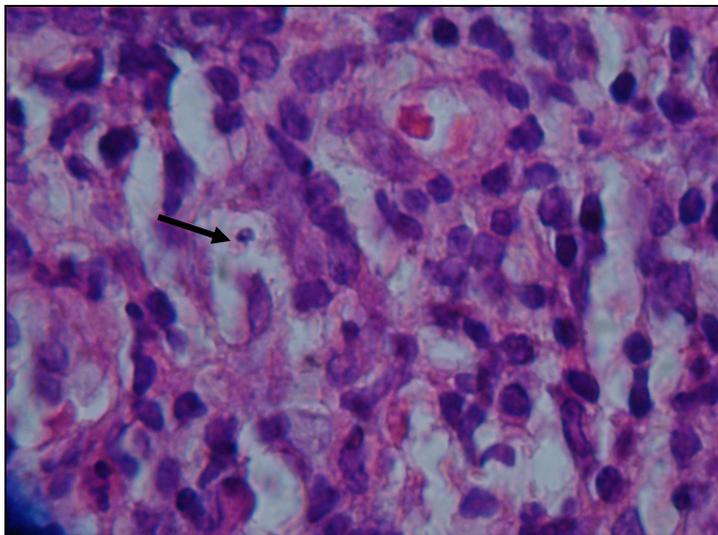


Figura 13 – Fotomicrografia de demonstração da *Leishmania* (seta). No córion (caso 14 – L=1), raros parasitas são encontrados dispersos e no interior do citoplasma de macrófagos/DCs em meio ao infiltrado inflamatório mononuclear (HE 1000x).
(Legenda: DCs= células dendríticas; L= *Leishmania*).

A classificação histopatológica (Gráfico 15A) mais freqüente foi a REC (66,67% - 12 casos), seguida das formas RENG (22,22% - 4 casos), REN (5,56% - 1 caso) e REG (5,56% - 1 caso). Em relação às formas clínicas (Gráfico 15B), a classe REC ocorreu em todas as formas clínicas existentes no estudo, sendo também a mais comumente encontrada na tardia e indeterminada. As únicas classes REN e REG foram encontradas, respectivamente, nas formas clínicas tardia e indeterminada.

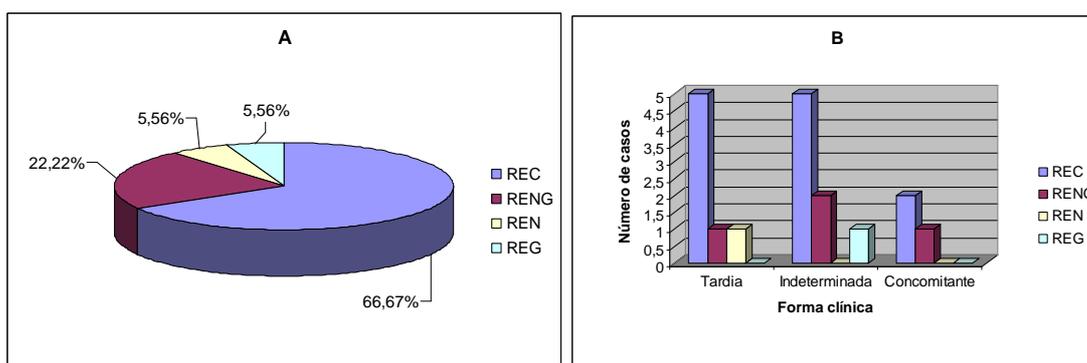


Gráfico 15 - Distribuição dos casos em relação à classificação histopatológica dos casos (A) e a ocorrências nas formas clínicas (B). (Legenda: REC=reação exsudativa celular; REG= reação exsudativa granulomatosa; REN= reação exsudativa necrótica; RENG= reação exsudativa necrótico-granulomatosa).

7.4 RESULTADOS DO ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

No córion, o infiltrado inflamatório das biópsias dos casos de LTA mucosa tiveram alguma positividade para todos os marcadores CD45ro, CD20, CD8, CD15, CD68 e Bcl-2 (Tabela 09, em anexo).

O marcador CD4 não obteve um padrão de reação satisfatório e não pode ser analisada *in situ* nas biópsias. As reações foram repetidas outras vezes, mas ocorreram áreas de reação inespecífica. Para tentar realizar a estimativas das células positivas para esse marcador foi subtraído o número de células positivas para CD45ro das outras positivas para o CD8 (Figura 16), para ter um número estimado de células T CD4⁺ (CD4e*), para que fosse possível fazer uma relação de número de células T CD8⁺/CD4⁺ nas variáveis do estudo.

Analisando a quantidade total de todas as células em relação às classes encontradas ($p < 0,05$), as classes histopatológicas são reconhecidas

estatisticamente diferentes entre si, exceto quando relacionado à REG e a REN (Tabela 01).

Teste de Wilcoxon	RENG - REC	REN - REC	REG - REC	REN - RENG	REG - RENG	REG - REN
Z	-2,37	-2,37	-2,37	-2,37	-2,37	-0,68
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,499

Tabela 01 – Teste de Wilcoxon relacionando as classes histopatológicas no estudo considerando a média de células positivas/mm² no estudo imuno-histoquímico. (Legenda: REC=reação exsudativa celular; REG= reação exsudativa granulomatosa; REN= reação exsudativa necrótica; RENG= reação exsudativa necrótico-granulomatosa).

A distribuição proporcional da média do número de células/mm² por classe histopatológica em relação aos marcadores da imuno-histoquímica para linfócitos T (CD45ro), linfócitos B (CD20), macrófagos (CD68) e neutrófilos (CD15) estão no Gráfico 16 e para linfócitos T CD8⁺ e estimado de CD4⁺ (CD4e*) no Gráfico 17. Os gráficos com a distribuição da média do número de células/mm² por marcadores celulares linfocitários (Gráfico 19) e de neutrófilos/macrófagos (Gráfico 20) nas classes histopatológicas, estão em anexo.

De forma geral, o infiltrado inflamatório é mais rico em linfócitos T (células CD45ro positivas – Figura 14) do que linfócitos B (células CD20 positivas – Figura 15). Além disso, estima-se que há maior proporção de linfócitos T CD4⁺ em todas as classes da forma mucosa da LTA, exceto no único exemplo da classe REG em que houve predomínio de linfócitos T CD8⁺.

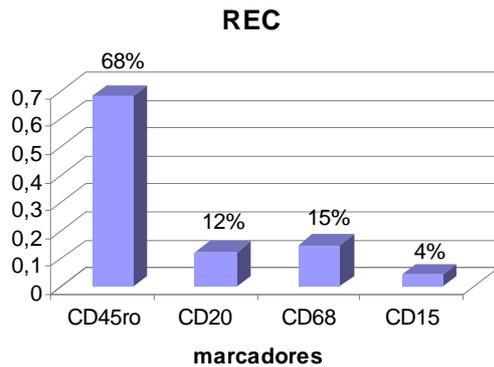
A quantidade de polimorfonucleares neutrófilos (células CD15 positivas – Figura 17) em cada classe é muito baixa.

Os macrófagos (células CD68 positivas – Figura 18) tiveram proporções próximas, sendo a maior na classe RENG.

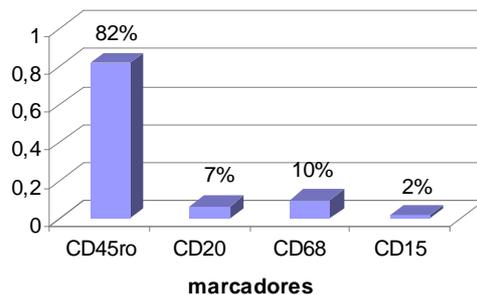
O Bcl-2 (Figura 19 e Gráfico 18) teve expressão em todas as classes, com maior número de células marcadas pelo na classe REG. Houve principalmente marcação de linfócitos do infiltrado inflamatório.

História de contato prévio com o antimonial pentavalente, presença de granulomas ou parasitas identificados ao exame histopatológico não foram critérios estatisticamente significativos ($p > 0,05$) para relacionar a existência das diferenças entre os números de células positivas/mm² em relação a todos os marcadores da imuno-histoquímica.

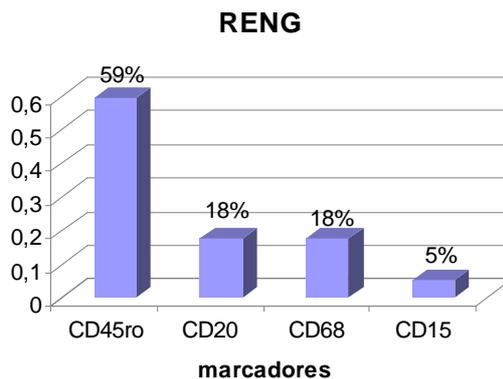
Marcador	Média de células/mm ²
CD45ro	4104,8
CD20	749,4
CD68	895,5
CD15	260,1



Marcador	Células/mm ²
CD45ro	5.961
CD20	486
CD68	729
CD15	127



Marcador	Média de células/mm ²
CD45ro	4435,5
CD20	1316,25
CD68	1322
CD15	398,5



Marcador	Células/mm ²
CD45ro	2.616
CD20	1.898
CD68	347
CD15	231

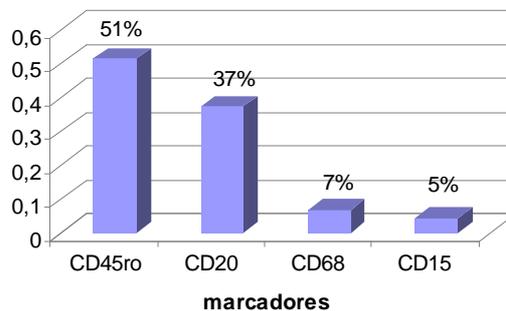
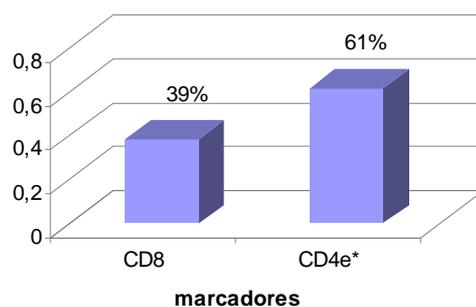


Gráfico 16 – Distribuição proporcional da média do número de células/mm² por classe histopatológica em relação aos marcadores da imuno-histoquímica para linfócitos T (CD45ro), linfócitos B (CD20), macrófagos (CD68) e neutrófilos (CD15).

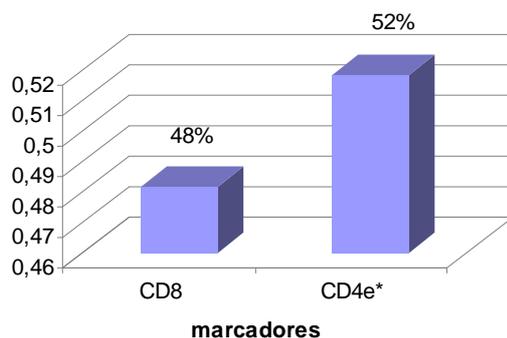
REC

Marcador	Média de células/mm ²
CD8	1580,7
CD4e*	2.524



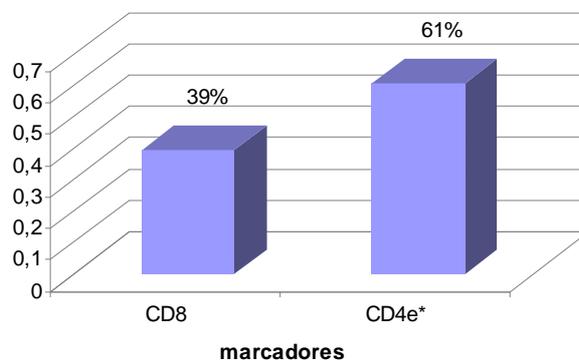
REN

Marcador	Células/mm ²
CD8	2.870
CD4e*	3.090



RENG

Marcador	Média de células/mm ²
CD8	1747,25
CD4e*	2.688



REG

Marcador	Células/mm ²
CD8	2.072
CD4e*	544

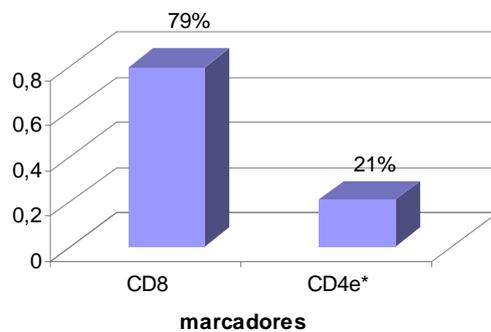


Gráfico 17 – Distribuição proporcional da média do número de células/mm² por classe histopatológica em relação aos marcadores da imuno-histoquímica para linfócitos T CD8⁺ e estimado de CD4⁺ (CD4e*).

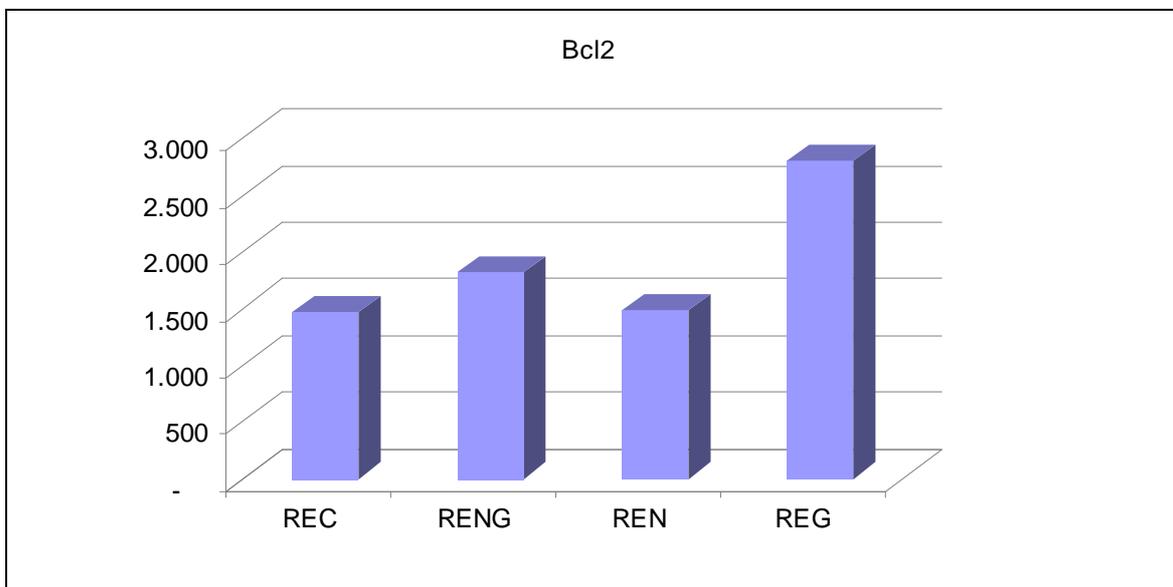


Gráfico 18 – Distribuição da média do número de células/mm² por classe histopatológica em relação ao marcador imuno-histoquímico Bcl-2 para apoptose.

Marcador	Contato prévio									
	Sim	Não	CD45ro	CD20	CD8	CD68	CD15	Bcl2	CD4	
CD45ro	4567	3751								
CD20	882	1030	Mann-Whitney U	25	31	28	14	31	28,5	17
CD8	1634	1861	Z	-0,689	-0,053	-0,370	-1,852	-0,053	-0,318	-1,535
CD68	1163	693	Asymp. Sig. (2-tailed)	0,491	0,958	0,711	0,064	0,958	0,751	0,125
CD15	288	281								
Bcl2	1592	1693								
CD4	2933	1889								

Tabela 02 – À esquerda, distribuição da média de células positivas/mm² por marcador da imuno-histoquímica em casos com e sem contato prévio com antimonial pentavalente. À direita, Teste de Mann-Whitney U avaliando essa relação.

Marcador	Granuloma									
	Sim	Não	CD45ro	CD20	CD8	CD68	CD15	Bcl2	CD4e*	
CD45ro	4.071	4.273								
CD20	1.433	725	Mann-Whitney U	23,5	13	27	23	12	14	23
CD8	1.812	1.698	Z	-0,453	-1,643	-0,057	-0,510	-1,756	-1,531	-0,510
CD68	1.127	880	Asymp. Sig. (2-tailed)	0,650	0,100	0,955	0,610	0,079	0,126	0,610
CD15	365	248								
Bcl2	2.011	1.465								
CD4e*	2.259	2.575								

Tabela 03 – À esquerda, distribuição da média de células positivas/mm² por marcador da imuno-histoquímica em casos com e sem granulomas. À direita, Teste de Mann-Whitney U avaliando essa relação.

Marcador	Parasita									
	Sim	Não	CD45ro	CD20	CD8	CD68	CD15	Bcl2	CD4e*	
CD45ro	4.353	4.125								
CD20	1.003	913	Mann-Whitney U	27	25	26	29	24	26	23
CD8	1.593	1.818	Z	-0,326	-0,542	-0,434	-0,108	-0,651	-0,434	-0,759
CD68	953	960	Asymp. Sig. (2-tailed)	0,745	0,588	0,664	0,914	0,515	0,664	0,448
CD15	260	299								
Bcl2	1.682	1.608								
CD4e*	2.760	2.306								

Tabela 04 – À esquerda, distribuição da média de células positivas/mm² por marcador da imuno-histoquímica em casos com e sem identificação de *Leishmania* no estudo histopatológico. À direita, Teste de Mann-Whitney U avaliando essa relação.

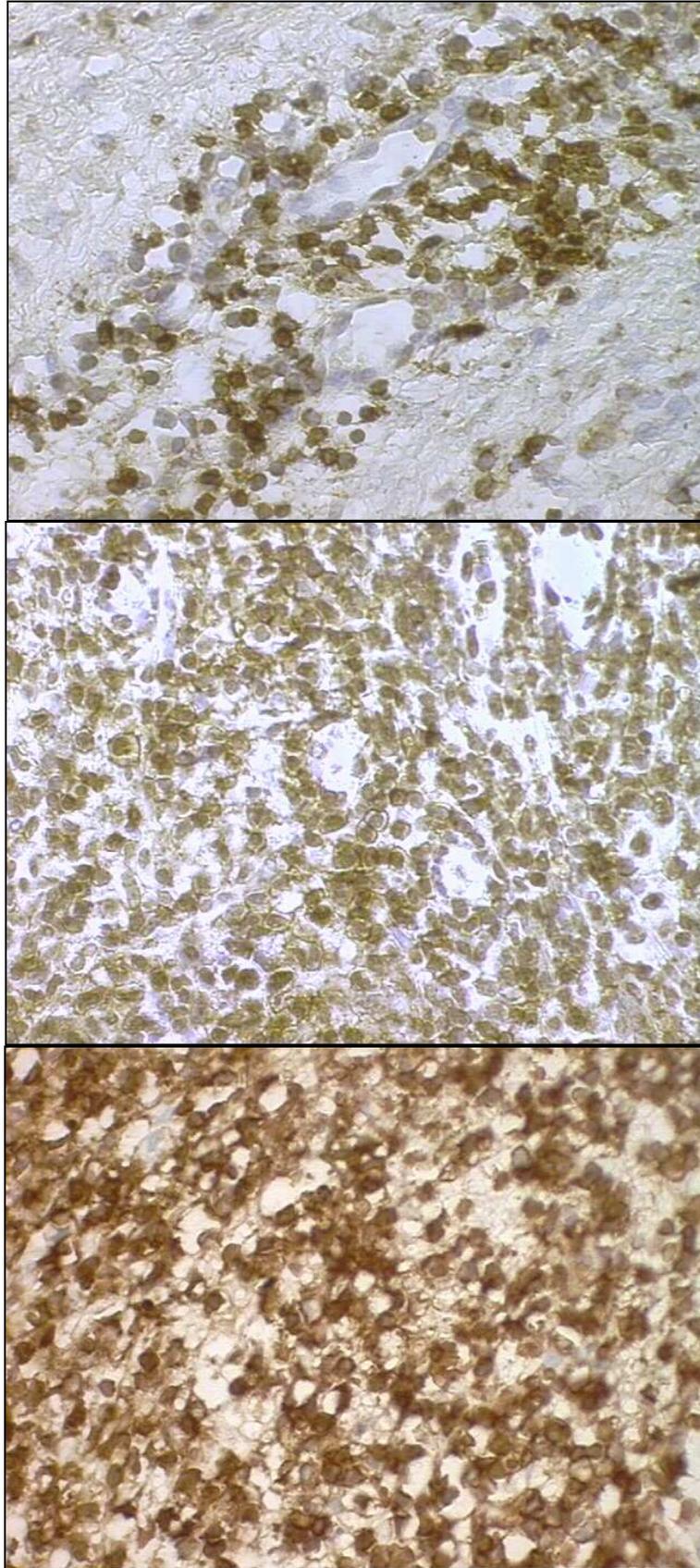


Figura 14 - Fotomicrografias de reações imuno-histoquímicas para o CD45ro. Acima: caso 4 – REC; ao centro: caso 17 – RENG; abaixo: caso 5 – REN (IHQ - 400x). (Legenda: REC= reação exsudativa celular; REN= reação exsudativa necrótica; RENG= reação exsudativa necrótico-granulomatosa).

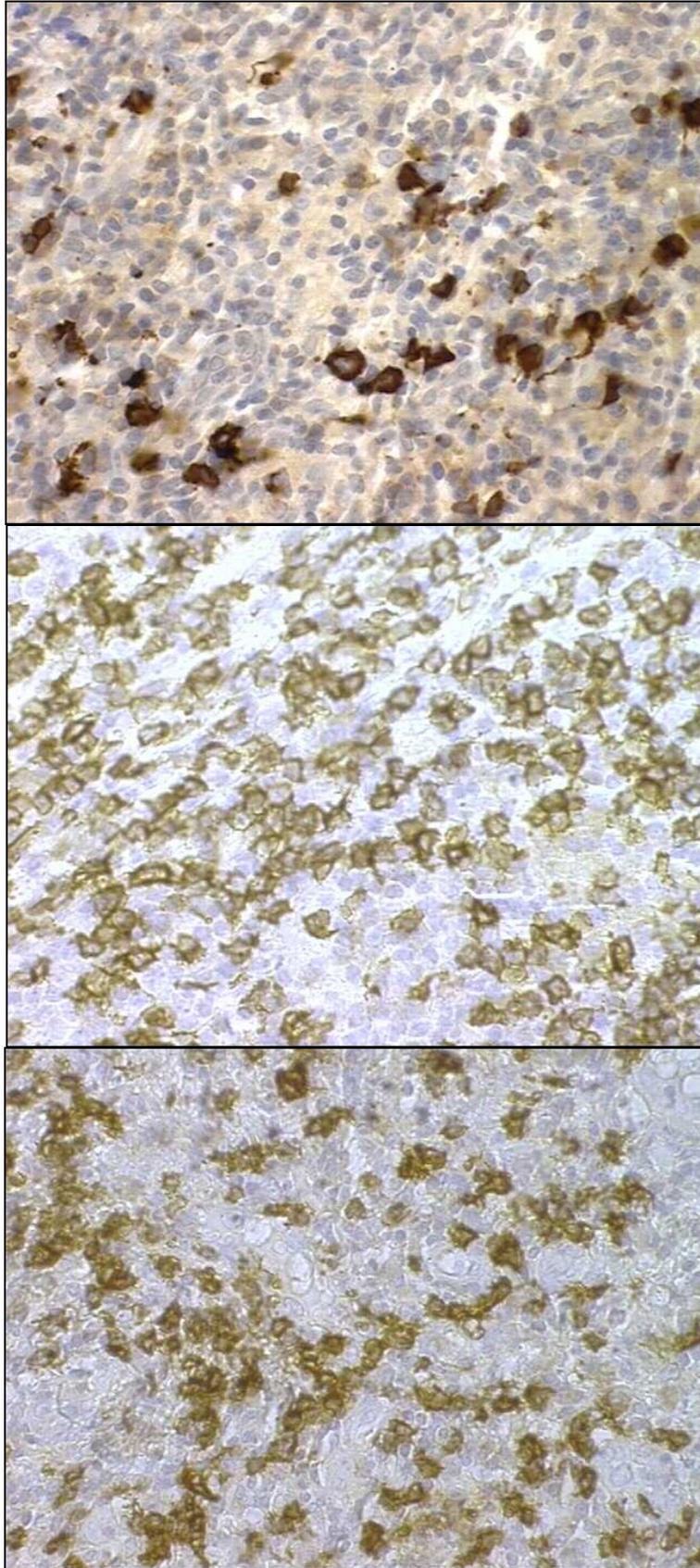


Figura 15 - Fotomicrografias de reações imuno-histoquímicas para o CD20. Acima: caso 3 – REC; ao centro: caso 17 – RENG; abaixo: caso 6 – REG (IHQ - 400x). (Legenda: REC= reação exsudativa celular; REG= reação exsudativa granulomatosa; RENG= reação exsudativa necrótico-granulomatosa).

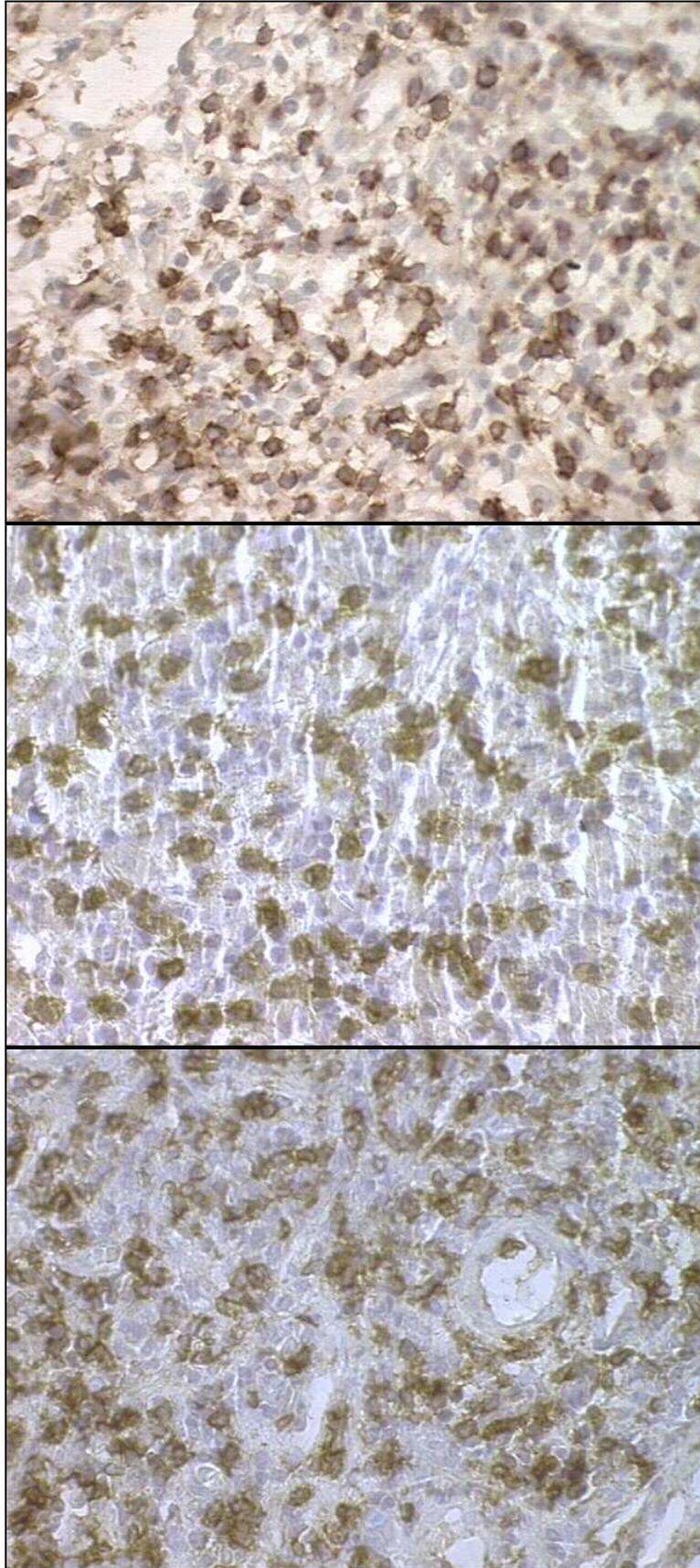


Figura 16 - Fotomicrografias de reações imuno-histoquímicas para o CD8. Acima: caso 5 – REN; ao centro: caso 17 – RENG; abaixo: caso 6 – REG (IHQ - 400x). (Legenda: REG= reação exsudativa granulomatosa; REN= reação exsudativa necrótica; RENG= reação exsudativa necrótico-granulomatosa).

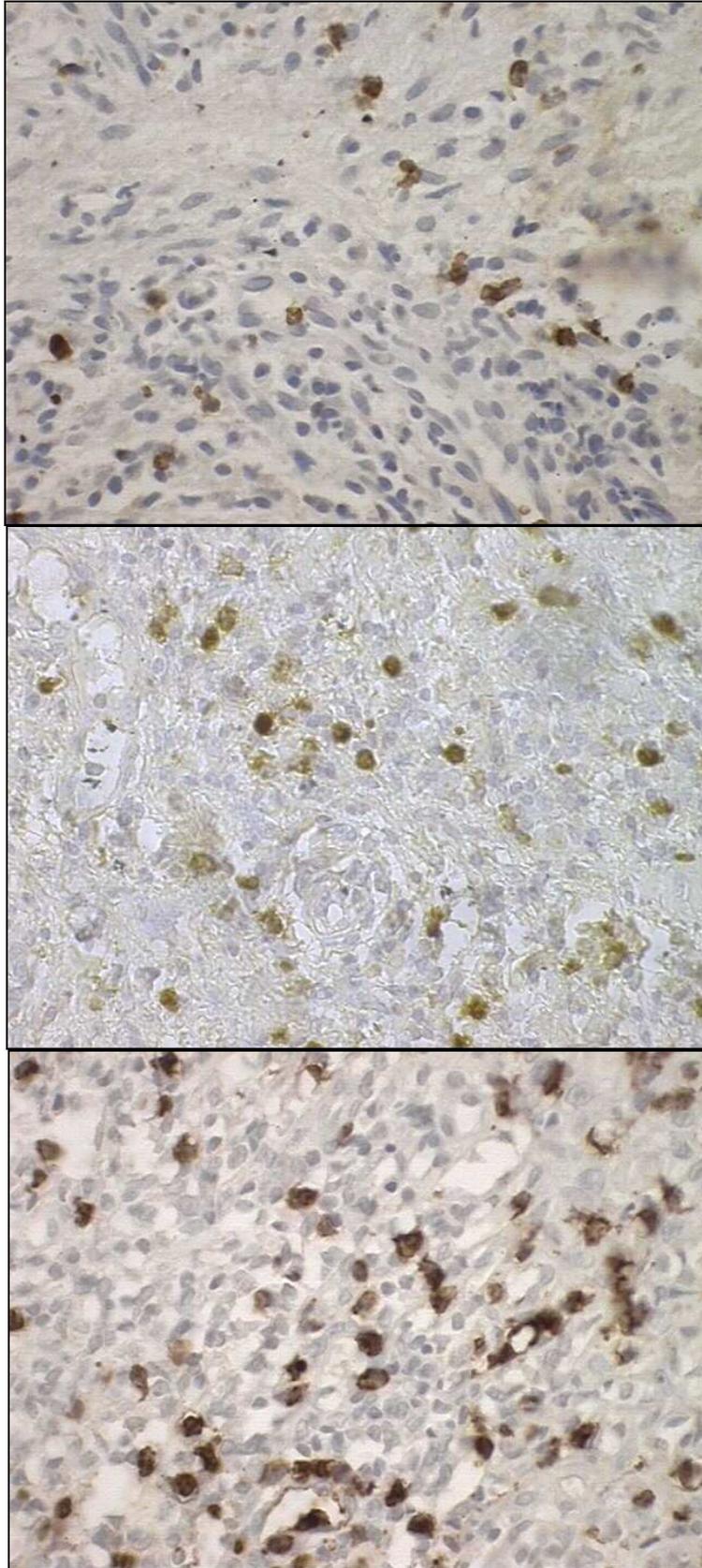


Figura 17 - Fotomicrografias de reações imuno-histoquímicas para o CD15. Acima: caso 12 – REC; ao centro: caso 6 – REG; abaixo: caso 5 – REN (IHQ - 400x). (Legenda: REC= reação exsudativa celular; REG= reação exsudativa granulomatosa; REN= reação exsudativa necrótica).

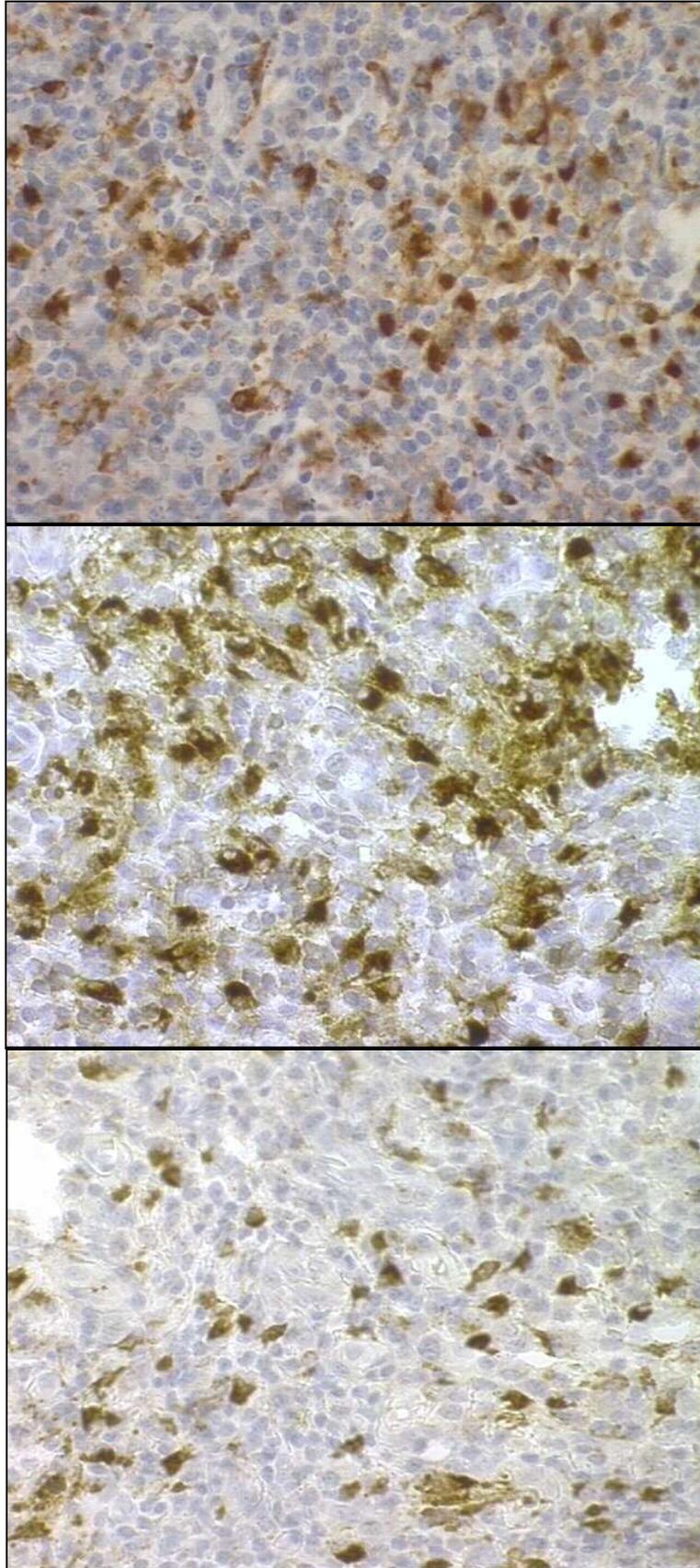


Figura 18 - Fotomicrografias de reações imuno-histoquímicas para o CD68. Acima: caso 3 – REC; ao centro: caso 17 – RENG; abaixo: caso 18 – REC (IHQ - 400x). (Legenda: REC= reação exsudativa celular; REN= reação exsudativa necrótica; RENG= reação exsudativa necrótico-granulomatosa).

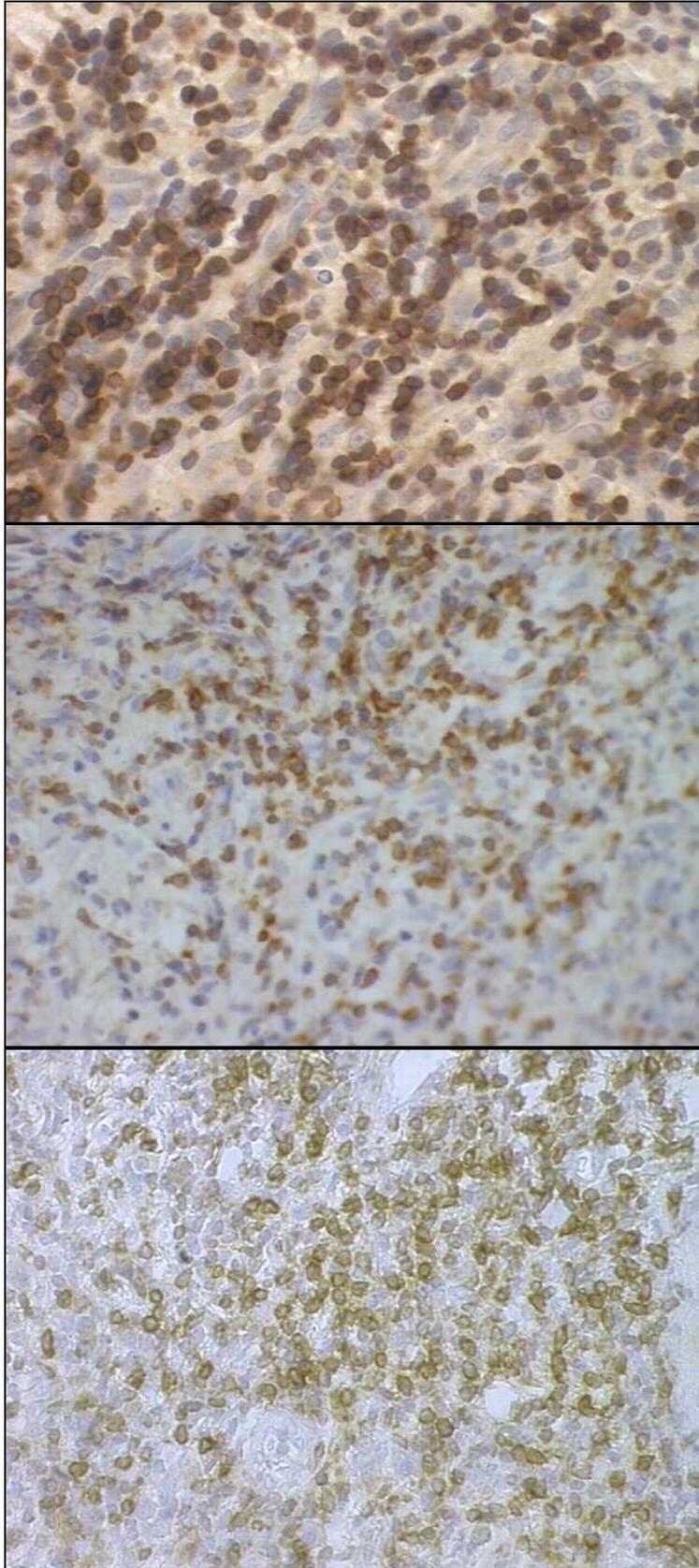


Figura 19 - Fotomicrografias de reações imuno-histoquímicas para o Bcl-2. Acima: caso 2 – RENG; ao centro: caso 14 – REC; abaixo: caso 6 – REG (IHQ - 400x). (Legenda: REC= reação exsudativa celular; REG= reação exsudativa granulomatosa; RENG= reação exsudativa necrótico-granulomatosa).

8 DISCUSSÃO

No estudo, foram analisados casos da forma mucosa da LTA no HuB, correlacionando dados clínicos e laboratoriais com os achados histopatológicos e imuno-histoquímicos.

Na revisão dos prontuários, houve certa dificuldade na descrição dos casos até porque não existe um protocolo a ser preenchido no atendimento dos pacientes com LTA. Isso poderia sintetizar muitas informações e facilitar o acesso às mesmas. Muitos dados ficaram incompletos e alguns casos não foram incluídos no estudo, já que a identificação da *Leishmania* nem sempre é possível por métodos histopatológicos e parasitológicos. Assim, a completa informação de dados clínicos e laboratoriais é de sobremaneira importante para a definição de caso.

Uma limitação deste estudo foi a não identificação da espécie de *Leishmania* dos casos estudados. Sabe-se que espécies diferentes podem produzir formas clínicas e padrões histopatológicos diferentes. Entretanto, de acordo com outros estudos, nas regiões de onde procederam os pacientes há predomínio de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, além do próprio tropismo dessa espécie para as mucosas nasais (SAMPAIO & PAULA, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Como a maioria das biópsias eram de lesões ulceradas, algumas reações tiveram que ser repetidas devido à ocorrência de reações inespecíficas (*background*) em áreas próximas à de necrose tecidual. Sendo que o marcador CD4 não funcionou nos fragmentos, mesmo testando outras reações sucessivas. Além disso, a quantidade de material nos blocos de parafina dos casos não foi suficiente em dois casos (11 e 15) para realizar as reações imuno-histoquímicas.

Foram analisados 18 casos da forma mucosa da LTA que foram atendidos no ambulatório do HuB, no período compreendido entre o ano de 2001 e 2007. A maioria dos casos foi do sexo masculino (77,78%) e com atividade ligada à zona rural, sendo a profissão de lavrador (33,33%) a mais predominante. A média de idade dos pacientes do estudo foi de 50 anos,

variando de 11 a 75 anos. A existência de crianças reforça a hipótese de transmissão peridomiciliar em áreas peri-urbanas (SAMPAIO & PAULA, 1999).

A maioria dos casos foi concentrada na região Centro-Oeste, confirmando, de acordo com dados do Ministério da Saúde, esta região como a segunda em incidência de casos de LTA no Brasil: 33,30 casos/100mil habitantes no ano de 2005 (www.datasus.gov.br). O HuB atrai pacientes de outros estados vizinhos, principalmente da região Norte e Nordeste. Isso não se deve somente pela sua localização na região central do Brasil, mas também por motivos históricos e por ser reconhecido como um centro de referência e de excelência no tratamento da LTA. Além disso, a existência de casos naturais e procedentes do próprio Distrito Federal já condiz com a realidade de casos de LTA ocorrido nessa região como relatado por SAMPAIO & PAULA (1999). Nesse estudo, foram descritos 11 casos de LTA de pacientes residentes no Distrito Federal e que permaneceram na região num período de seis meses a dois anos, antes do início da doença.

Os achados clínicos encontrados estão de acordo com outros estudos (LESSA et al., 2007; AMATO et al., 2007).

A mucosa nasal é o local mais afetado pelas lesões da LTA na forma mucosa. Em todos os casos do estudo foi descrita alteração nessa topografia. Em seguida, estão a orofaringe (palato mole e duro), lábios e laringe. Em três casos (caso 01, 11 e 16), estava descrito lesão de pele ulcerada que não tinham relato de biópsia cutânea. Pela suspeita clínica desses casos para LTA e confirmação da doença na biópsia da lesão mucosa, estes casos foram alocados como exemplos da forma clínica concomitante da LTA mucosa.

Entre as comorbidades encontradas, tiveram outras doenças infecciosas e parasitárias: Malária, Doença de Chagas, Hepatite-B e AIDS, sendo que as duas primeiras são comumente encontradas em pacientes com LTA por apresentarem, de certa forma, o mesmo ambiente de contágio dos agentes etiológicos (LESSA et al., 2007; AMATO et al., 2007).

Os sintomas citados foram variados. Foram relatados desde sintomas locais, como a obstrução nasal (em 25% dos casos), até sistêmicos como febre e inapetência. A obstrução nasal, coriza e epistaxe são os sintomas mais precoces que ocorrem quando há edema e hiperemia do septo nasal.

Com agravamento do quadro, a pele do nariz se torna espessada e edemaciada, configurando o conhecido “nariz de tapir”. A perfuração do septo nasal é um evento subsequente, sendo sinal de agressão tecidual que pode se estender para todo nariz, lábios e palato (LESSA et al., 2007).

Ao exame ORL, predominou lesão infiltrada com algum grau de perda da integridade do epitélio (alteração inflamatória), sendo a ulceração com perfuração do septo nasal a mais comumente encontrada (61,11%). A descrição da maioria das lesões encontradas nos prontuários foi sucinta.

Na revisão dos casos, a forma clínica da LTA não era estabelecida pelo médico assistente de forma objetiva. Foram classificadas no decorrer do estudo de acordo com os achados clínicos e laboratoriais dos prontuários. Houve predomínio da forma indeterminada (44,44%), ou seja, casos em que não se definiu a porta de entrada do parasita, supondo que estes não tiveram uma manifestação cutânea prévia (MINISTÉRIO, 2006).

Na LTA mucosa, a não ocorrência de forma primária sugere que as lesões sejam mesmo evoluções da forma cutânea. Além disso, a existência de formas concomitantes (lesões cutâneas e mucosas ativas), já previamente descritas por vários autores, comprova a necessidade do exame ORL de todos os casos recém diagnosticados de LTA cutânea (BOAVENTURA et al., 2006).

A IRM foi realizada em 88,89% dos casos do estudo e todos eles houve formação de nodulação que variou de 7 a 38mm de diâmetro, ou seja, positivos. Isso está de acordo com a literatura, em que é descrita positividade acima de 95% em casos da forma mucosa. O resultado negativo é reservado aqueles com alguma forma de imunodepressão. Essa observação indica a IRM como um importante exame no apoio diagnóstico da LTA mucosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A IFA além de ser utilizada no diagnóstico da LTA, também tem aplicação no acompanhamento do tratamento e no seguimento após a cura da doença. Dos casos do estudo, em 88,89% foi encontrado a primeira IFA para o diagnóstico da LTA, sendo que em 25% desses casos o resultado foi não reagente e nos demais (reagentes) a titulação variou de 1/20 a 1/320 (43,75% delas com titulação de 1/80).

Em relação aos métodos parasitológicos (inoculação em *hamster*, esfregaço e cultura), não foi possível estabelecer um parâmetro de

comparabilidade entre eles, já que nem todos eles foram realizados em todos os casos e quando existia um deles faltava um ou os outros dois.

O tratamento de escolha, preconizado por AMATO et al., (2008) e pelo MINISTÉRIO DA SAÚDE (2006), da forma mucosa da LTA é o antimonial pentavalente (Glucantime®) na dose de 20mg/kg/dia por 30 dias e no máximo de 1275mg (3 ampolas). A droga de escolha de todos os casos foi o antimonial pentavalente, porém o registro do período de tratamento e o critério de cura dos casos do estudo não foram constantes. Exceto em casos de pacientes internados, em que foram descritos os 30 dias preconizados no tratamento, nem sempre foi encontrado referência ao número de doses utilizadas. Também não foi possível avaliar se houve resolução da lesão porque nem sempre era realizado um exame ORL de controle após o tratamento. Isso não permitiu que se fizesse uma correlação entre a resposta ao tratamento e a classe histopatológica.

Quanto a localização, a maioria das biópsias foram retiradas da mucosa nasal (55,56%) e no palato mole (33,33%). Além de serem as regiões mais afetadas pelas lesões da LTA, elas são as mais acessíveis para a obtenção fragmentos durante o exame ORL (LESSA et al., 2007).

As alterações histopatológicas epiteliais hiperplásicas e inflamatórias ocorreram em todos os casos, sendo que a primeira não foi aplicável ao caso 1, pelo fato que o fragmento foi retirado de uma área totalmente ulcerada. As alterações epiteliais formam combinadas já que sempre que há certo grau de hiperplasia, também existe nível de espongirose intra-epitelial para posterior perda da integridade da superfície (erosão/ulceração).

Todos os critérios das alterações histopatológicas referente ao infiltrado celular no córion foram presentes em algum dos casos, exceto os macrófagos vacuolizados. Esses macrófagos são células numerosas encontradas principalmente em lesões causadas pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e albergam grande quantidade de formas amastigotas no citoplasma. Sabendo da região em que se encontram os casos estudados e por se tratar da forma mucosa da LTA, explica-se a ausência dessas células (índice=0) em todos os casos do estudo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O

granuloma, apesar de ser um achado histopatológico facilmente identificado no corte histológico, esteve presente em apenas cinco casos do estudo.

Das alterações tissulares adaptativas/inflamatórias, a reação conjuntiva foi encontrada em variadas proporções, principalmente na circunjunção do infiltrado inflamatório visando à cicatrização tecidual. Enquanto que a necrose aguda/subaguda foi escassa, mas o seu reconhecimento é de grande importância porque a sua presença ou ausência implica na alteração da classe histopatológica (REC/REN ou RENG/REG).

A presença do parasita na histopatologia é uma forma rápida e de baixo custo para o diagnóstico da LTA, melhorando a assistência ao paciente e início precoce do tratamento. Neste estudo, a demonstração da *Leishmania* pela histopatologia foi possível em 33,33% dos casos e de forma escassa (índice variando de 0 a 2), estando de acordo com outros estudos (ZAJTCHUCK et al, 1989). A utilização de métodos parasitológicos (cultura, inoculação em *hamster* e esfregaço) demonstrou ser uma forma de aumentar a demonstração do parasita, como visto pelo estudo. A demonstração do agente etiológico nos casos foi de 33,33% somente no método histopatológico para 44,44% quando foi aplicado algum método parasitológico, principalmente o esfregaço (MINISTÉRIO, 2006). Houve maior demonstração da *Leishmania* em casos que tiveram contato prévio com o antimonial pentavalente no tratamento da forma cutânea da LTA do que em casos de pacientes que nunca receberam esse tipo de tratamento. Desse fato, poderia investigar a possível seleção de cepas de *Leishmania* resistentes que poderiam ter maior evasão ao processo inflamatório e permanecerem mais tempo na lesão, sendo mais encontradas quando fossem tomados os fragmentos das mesmas.

O número pequeno de casos foi um importante empecilho para a estatística do estudo, dificultando conseguir outras formas clínicas de LTA mucosa que representassem outra maior quantidade das classes histopatológicas. Também pela própria distribuição da frequência das classes histopatológicas que tem proporções muito distintas, como observados mesmo em estudos com grandes amostras, a análise estatística, sobretudo dos marcadores imuno-histoquímicos, teria um resultado prejudicado. Como no estudo realizado por MAGALHÃES (1997), em que se tem relatado os achados histopatológicos do maior número de casos da forma mucosa da LTA (74

casos), foram encontradas as seguintes proporções das classes histopatológicas: REC – 63,30%, REG – 13,50%, RENG – 10,80% e REN – 9,40%. Dados semelhantes foram encontrados neste estudo, em que a classe REC foi a mais freqüente (66,67% dos casos) e não foram encontrados exemplos das classes RES (reação exsudativa sarcoidiforme) e RET (reação exsudativa tuberculóide).

Neste estudo, percebe-se que uma forma clínica pode ter expressão em classes histopatológicas diferentes, pois constituem estágios evolutivos do processo inflamatório. Assim, uma classe histopatológica não define a forma clínica da LTA como em doenças como a Hanseníase, na qual o patologista contribui com o clínico na definição da forma da doença. No geral, a classe REC predominou no estudo, mas também em relação a todas as formas clínicas (tardia, indeterminada e concomitante). As classes REN e RENG parecem intermediárias às classes REC e REG, sendo a necrose tecidual transitória. Essa ocorre na classe REC, tornando-a REN, suscitando a formação do granuloma e constituindo a classe RENG. Na seqüência, há resolução da necrose e restando a classe REG. Dessa, ocorre dissolução do granuloma que dá lugar à cicatrização tecidual ou manutenção da resposta exsudativa celular (MAGALHÃES, 1997).

O programa UnBVision (HORITA, 2001) foi o utilizado pela primeira vez em um estudo para avaliação do número de células positivas por campo em imagens capturadas de cortes histológicos de tecidos. Ele obteve excelente praticidade e aplicabilidade na contagem das células positivas pelos marcadores imuno-histoquímicos, facilitando sobremaneira este estudo.

Analisando a quantidade total de células positivas, quando comparadas as classes entre si, elas se mostraram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), exceto quando se comparou a classe REG/REN em que não teve significância estatística ($p = 0,499$). Isso mostra que, apesar das classes serem estágios evolutivos de um processo inflamatório, elas são também, além de qualitativamente, quantitativamente distintas.

No estudo imuno-histoquímico, a maior proporção de linfócitos T em todos os casos em relação aos linfócitos B comprova que a resposta imune predominante na LTA é mais celular do que humoral. Embora esta também

exista já que foi encontrada alguma quantidade de plasmócitos em 94,44% casos (MURRAY et al., 2005).

De acordo com outros estudos, estima-se que na forma mucosa da LTA há predomínio de linfócitos T CD4⁺ em relação aos linfócitos T CD8⁺ (BARRAL et al, 1987; COUTINHO et al., 2002; AMATO et al., 2003; SILVEIRA et al., 2004; MORGADO et al., 2007; TUON et al., 2008).

Futuramente, a utilização da imuno-histoquímica para identificar as citocinas INF- γ , TNF- α , IL12, IL-4 e IL-10, para complementar este estudo poderia remeter a qual resposta por linfócitos T CD4⁺ predomina: Th1 ou Th2, correlacionando com achados histopatológicos como a presença de granulomas e do parasita.

Somente no caso 6, único exemplo de classe histopatológica REG, houve um predomínio de linfócitos T CD8⁺ em relação aos linfócitos T CD4⁺. Buscando nos dados clínicos/ laboratoriais desse paciente, percebe-se que ele tinha a IFA de maior titulação do estudo (1/320) e IRM forte reator (27x27mm), além de uma lesão da mucosa nasal/ palato somente infiltrada. Provavelmente, trata-se de uma lesão que teve um aumento transitório de linfócitos T CD8⁺ para a destruição citotóxica de macrófagos parasitados, como descritos em alguns estudos, com evolução pra uma cura (RUIZ & BECKER, 2007; TUON et al., 2008).

A positividade de células inflamatórias para o Bcl-2 foi semelhante entre as classes histopatológicas, sendo maior no único exemplo da classe REG. Indicando que há um prolongamento do tempo de vida de células inflamatórias, em sua maioria linfócitos, nas lesões. Isso nos linfócitos seria positivo para a manutenção do processo inflamatório celular. Entretanto, a existência, mesmo em menor proporção, da inibição da apoptose em macrófagos permitiria a permanência da principal célula que alberga o parasita, sendo uma forma de persistência deste no tecido (MATLASHEWSKI, 1994). Melhores conclusões em relação a apoptose, neste estudo, seriam possíveis se também tivesse sido realizados marcadores pró-apoptóticos e outros antiapoptóticos.

As diferenças importantes que ocorreram no número de células positivas/mm² em relação a algum marcador foram em classes unitárias (REG

e REN), o que dificultou a comparabilidade entre elas por não existir outra amostra para observar a manutenção do padrão de resposta inflamatória.

Como algumas classes histopatológicas não se repetiram no estudo para que elas pudessem ser comparadas e explicar as diferenças entre a população celular encontrada no perfil imuno-histoquímico, foram analisados outros critérios. Para isso foram confrontados grupos com contato prévio com o antimonial pentavalente, no tratamento da forma cutânea da LTA, aqueles com presença de granulomas ou de *Leishmania* no método histopatológico. Todos esses critérios não tiveram significância estatística ($p > 0,05$) para explicar a diferença de número de células positivas para todos os marcadores aplicados no estudo.

9 CONCLUSÃO

1. A maioria dos pacientes do HuB no estudo é do sexo masculino, ligado à atividade rural, naturais e procedentes da região Centro-Oeste, com média de idade de 50 anos, com queixa de obstrução nasal e lesão de mucosa nasal infiltrada com ulceração e perfuração de septo, ao exame ORL.
2. Laboratorialmente, todos os pacientes que realizaram IRM tiveram resultados positivos, predomínio de IFA reagente (titulação de 1/80), baixa identificação de parasitas por métodos parasitológicos e histopatológicos (44,44%) e tendo o Glucantime® como a droga de escolha para tratamento.
3. As formas clínicas da LTA mucosa identificadas foram, em ordem decrescente de frequência: a indeterminada, tardia e concomitante, sendo a ocorrência da última justificativa para exame ORL em todos os pacientes com lesão cutânea, recém diagnosticada como LTA.
4. As biópsias foram obtidas mais frequentemente da mucosa nasal e palato mole, com alterações importantes do epitélio com hiperplasia e erosão/ulceração.
5. Nas alterações inflamatórias celulares, há predomínio de um infiltrado inflamatório linfocitoplasmocitário denso ocasionalmente com granulomas mal formados, alguns com células de Langhans, e ausência de macrófagos vacuolizados.
6. Em relação às alterações tissulares inflamatórias/ adaptativas, a reação conjuntiva está mais presente na periferia do infiltrado inflamatório evoluindo para a cicatrização das lesões; a necrose aguda/ subaguda é pouco frequente e discreta, mas importante na classificação das lesões.
7. Os parasitas foram encontrados de forma escassa e em poucos casos na histopatologia (33,33% dos casos – principalmente naqueles que tiveram contato prévio com Glucantime®).
8. A classe REC foi a mais frequente (66,67%) e não foram encontradas as formas RES e RET.
9. Pela primeira vez foi utilizado o UnBVision (HORITA, 2001) em um estudo e atestada a sua aplicabilidade e praticidade na quantificação de

células em imagens digitais capturadas em microscopia óptica, ainda mais em reações imuno-histoquímicas.

10. Quando as classes histopatológicas foram comparadas entre si, em relação à quantidade de células positivas no perfil imuno-histoquímico, houve significância estatística ($p < 0,05$) entre elas, exceto entre as classe REG e REN ($p > 0,05$), mostrando que a maioria delas também são, além de qualitativamente, quantitativamente diferentes.

11. Em todos os casos houve predomínio de células T (CD45ro positivas) em relação aos linfócitos B (CD20 positivas) atestando que a resposta imune da LTA mucosa é mais celular que humoral.

12. De acordo com outros estudos, estima-se que na forma mucosa da LTA há predomínio de linfócitos T CD4⁺ em relação aos linfócitos T CD8⁺, exceto no único exemplo de caso REG.

13. A utilização de um perfil imuno-histoquímico, em estudos futuros, para estudar as citocinas presentes nas lesões pode contribuir na elucidação do paradigma entre a resposta imune Th1 e Th2.

14. A presença de considerável positividade celular para o Bcl-2, no infiltrado inflamatório das lesões, mostra que a apoptose pode ser detalhadamente explorada utilizando marcadores pró-apoptóticos e outros anti-apoptóticos.

15. Confrontados grupos com contato prévio com o antimonial pentavalente, no tratamento da forma cutânea da LTA, aqueles com presença de granulomas ou de *Leishmania* no método histopatológico não obtiveram significância estatística ($p > 0,05$) para explicar a diferença da freqüência de células estudadas na imuno-histoquímica.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander, J. & Bryson, K. **T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm.** Immunology Letters. Volume: 99, pp: 17–23. 2005.
2. Almeida, MC., Vilhena, V., Barral, A. & Barral-Netto, M. **Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps.** A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. Vol. 98(7), pp: 861-870. 2003.
3. Alves V. A. F., Bacchi, C. E. & Vassalo, J. **Manual de imuno-histoquímica.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.
4. Amato, V. S., Tuon, F. F., Bacha, H. A., Neto, V. A., Nicodemo, A. C. **Mucosal leishmaniasis .Current scenario and prospects for treatment.** Acta Trop. 2008 Jan 105(1):1-9. 19. 2007.
5. Amato, V.S., De Andrade, H. F., Duarte, M. I. **Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment.** Acta Trop. Jan 85(1), pp: 39-49. 2003.
6. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana – Diagnóstico clínico e diferencial.** Editora MS. 1ª edição. Ministério da Saúde. Brasília – DF. 2006.
7. Awasthi, A., Kumar, R. & Saha, M. B. **Immune response to *Leishmania* infection.** Indian J Med Res. Volume 119, pp: 238-258. 2004.
8. Barral, A., Jesus, A.R., Almeida, R.P., Carvalho, E.M., Barral-Netto, M., Costa, J.M., Badaró, R., Rocha, H. & Johnson, W.D. **Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.** Parasite Immunology. Jul;9(4), pp: 87-97. 1987.
9. Belkaid, Y et al. **The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potencial of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure.** The Journal of Experimental Medicine. Volume 19;194(10), pp: 1497-506. 2001.
10. Boaventura, V. S., Café, V., Costa, J., Oliveira, F., Báfica, A. Rosato, A. Freitas, L. A. R., Brodskyn, C., Barral-Neto, M. & Barral, A. **Short report:**

- concomitant early mucosal e cutaneous leishmaniasis in Brazil.** American Journal Trop. Méd. Hyg. 75 (2), pp: 267-269. 2006
11. Bogdan, C., Gessner, A., Solbach, W. & Rijllinghoff, M. **Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites.** Current Opinion in Immunology. Volume: 6, pp: 517-525. 1996.
12. Brandonisio, O., Spinelli, R. & Pepe, M. **Dendritic cells in *Leishmania* infection.** *Microbes and Infection.* Volume 6, pp: 1402–1409. 2004.
13. Coutinho, S. G., Pirmez, C., Da-Cruz, A. M. **Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients.** Trans R Soc Trop Med Hyg. Abril, 96 Suppl 1: pp: 173-8. 2002.
14. Da-Cruz, A. M., Bittar, R., Mattos, M., Oliveira-Neto, M. P., Nogueira, R., Vanessa Pinho-Ribeiro, V., Azeredo-Coutinho, R. B. & Coutinho, S. G. **T-Cell-Mediated Immune Responses in Patients with Cutaneous or Mucosal Leishmaniasis: Long-Term Evaluation after Therapy.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Rio de Janeiro, Brasil. Março, pp:251–256. 2002.
15. Handman, E. & Bullen, D. V. R. **Interaction of *Leishmania* with the host macrophage.** TRENDS in Parasitology Vol.18 N^o.8, pp: 332-334. 2002.
16. Horita, L. G. **UnBVision: uma solução para a análise e tratamento de imagens digitais.** Trabalho de Bacharelado em Ciências da Computação. Brasília - DF. UnB. 2001.
17. Kummar, V., Abul, K. A. & Nelson, F. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças.** 7^a edição. Elsevier. Rio de Janeiro. 2005.
18. Lodge, R. & Descoteaux, A. **Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*.** Clinical Immunology. Volume 114, pp: 256 – 265. 2005.
19. Magalhães, A.V. **Comprehensive histopathological studies on tegumentary leishmaniasis.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 30 (Supl. I), pp: 160-161. 1997.
20. Magalhães, A.V., Moraes, M. A. P., Raick, A. N., Llanos-Cuentas, A., Costa, J. M. L., Cuba, C. C. & Marsden, P. D. **Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 28 (4), pp: 253-262. 1986. a

21. Magalhães, A.V., Moraes, M. A. P., Raick, A. N., Llanos-Cuentas, A., Costa, J. M. L., Cuba, C. C. & Marsden, P. D. **Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 2. Resposta humoral tissular.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 28 (5), pp: 293-299. 1986 b.
22. Magalhães, A.V., Moraes, M. A. P., Raick, A. N., Llanos-Cuentas, A., Costa, J. M. L., Cuba, C. C. & Marsden, P. D. **Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 3. Reação celular nos tecidos.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 28 (5), pp: 300-311. 1986 c.
23. Magalhães, A.V., Moraes, M. A. P., Raick, A. N., Llanos-Cuentas, A., Costa, J. M. L., Cuba, C. C. & Marsden, P. D. **Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 4. Classificação histopatológica.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 28 (6), pp: 421-430. 1986 d.
24. Marzochi, M. C. & Marzochi, K. B. **Proposta de uma classificação clínica simplificada para as leishmanioses tegumentares do Novo Mundo.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (27) 91. 1994.
25. Mauël, J. **Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infection.** Journal of Leukocyte Biology. Volume 47, pp:187-193. 1990.
26. Medeiros, A. C. L. & Roselino, A. M. F. **Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje.** Anais Brasileiros de Dermatologia. Julho-agosto. Rio de Janeiro..Volume 74(4), pp: 329-336. 1999
27. Ministério da Saúde - **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana.** 5ª edição. Brasília – DF. 2000.
28. Moore, K. J. & Matlashewski, G. **Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis.** Journal of Immunology 152(6), pp: 2930-7. 1994.
29. Morgado, F.N., Schubach, A., Rosalino, C. M., Quintella, L. P., Santos, G., Salgueiro, M. & Conceição-Silva, F. **Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis?** British Journal of Dermatology. 2008 Jan;158(1), pp: 50-8. 2007

30. Motta AC, Lopes MA, Ito FA, Carlos-Bregni R, de Almeida OP, Roselino AM. **Oral leishmaniasis: a clinicopathological study of 11 cases.** Oral Diseases. São Paulo, Brasil. Maio;13(3), pp: 335-40. 2007.
31. Murray, H. W., Berman, J.D., Davies, C. R. & Saravia, N. G. **Advances in leishmaniasis.** The Lancet. Volume 366, pp:1561–77. 2005.
32. Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C, Pérez JM. **Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness?** Trends Parasitology. Agosto 20(8), pp: 375-80. 2004.
33. Peters, N. & Sacks, D. **Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells.** Immunological Reviews. Volume 213, pp: 159–179. 2006.
34. Piscopo, T. V & Azzopardi, C. M. **Leishmaniasis.** Postgraduate Medical Journal. Volume 82, pp: 649–657. 2006.
35. Reithinger, R., Dujardin, J., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. & Brooker, S. **Cutaneous leishmaniasis.** The Lancet Infectious Diseases. Volume 7, pp: 581–96. 2007.
36. Ridley, D. S. **The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 73, pp: 150-160. 1979.
37. Ruiz, J. H. & Becker, I. **CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis.** Parasite Immunol. Dec;29(12), pp: 671-8. 2007.
38. Sampaio, R. N. R. & Paula, C. D. R. **Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 32 (5), pp: 523-528, set-out, 1999.
39. Santarém, N., Silvestre, R., Tavares, J., Silva, M., Cabral, S., Maciel, J. & Silva, A. C. **Immune Response Regulation by *Leishmania* Secreted and Nonsecreted Antigens.** Journal of Biomedicine and Biotechnology. pp: 10. 2007.
40. Silveira, F. T., Lainson, R. & Corbett, C. E. **Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004 May;99(3), pp: 239-51. 2004.

41. Stebut, von E. **Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy.** Experimental Dermatology. Volume 16, pp: 340–346. 2007.
42. Teixeira, M.J., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Barral-Netto, M. & Barral, A. **Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis.** TRENDS in Parasitology. Volume.22 No.1, pp: 32-40. 2006.
43. Tuon, F. F., Gomes-Silva, A., Da-Cruz, A. M., Duarte, M. I., Neto, V. A., Amato, V. S. **Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis.** Clin Immunol. 2008 Sep;128(3), pp: 442-6. 2008.
44. Venuprasad, K., Banerjee, P. P., Chattopadhyay, S., Sharma, S., Pal, S., Parab, P. B., Mitra, D. & Saha, B. **Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN- γ secretion and restriction of *Leishmania* growth.** The Journal of Immunology. Volume: 169, pp: 920–928, 2002.
45. Werner, B., Campos, A. C. ; Nadji, M & Torres, L. F. B. **Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica.** Jornal Brasileiro de Patologia, volume 41, n. 5, pp: 353-364. 2005.
46. Zajtchuk, J. T., Casler, J. D., Netto, E. M., Grogl, M., Neafie, R. C. Hessel, C. R., Magalhães, A. V. & Marsden, P. D. **Mucosal Leishmaniasis in Brazil.** Laryngoscope, Vol 99, Nº 9, Setembro, pp: 925-939. 1989.
47. <http://www.datasus.gov.br>
48. <http://www.e-immunohistochemistry.info>

11 ANEXOS

ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	ÍNDICE					
	0	1	2	3	4	5
Alterações epiteliais HIPERPLÁSICAS	Ausência	Papiloms tose discretas a moderadas	Papilomatose acentuadas	Hiperplasia pseudoepiteliomatosa - Grau 1	Hiperplasia pseudoepiteliomatosa - Grau 2	Hiperplasia pseudoepiteliomatosa - Grau 3
Alterações epiteliais INFLAMATÓRIAS	Ausência	Espongiose discreta/moderada	Espongiose moderada/acentuada com induto fibrinoleucocitário	Erosão	Epitélio parcialmente ulcerado	Ulceração total sem representação epitelial
INFILTRADO celular global	Ausência	Escasso e difuso (ocupa menos que 25% do campo de 4x)	Infiltrado perivascular discreto (ocupa de 25% a 50% do campo de 4x)	Infiltrado perivascular moderado ou infiltrado difuso discreto (ocupa de 50% a 75% do campo de 4x)	Infiltrado difuso moderado (ocupa aproximadamente todo o campo de 4x)	Infiltrado difuso acentuado (ocupa mais que um campo de 4x)
CÉLULAS MONONUCLEARES	Ausência	Escassos e difusos	Pequenos acúmulos	Moderadamente abundantes	Abundantes	Abundantíssimos
MACRÓFAGOS vacuolizados	Ausência	Escassos e difusos	Pequenos acúmulos	Moderadamente abundantes	Abundantes	Abundantíssimos
CELÚLAS EPITELIÓIDES	Ausência	Escassos e difusos	Pequenos acúmulos	Moderadamente abundantes	Abundantes	Abundantíssimos
CÉLULAS DE LANGHANS	Ausência	Escassas em vias de diferenciação	Células diferenciadas em pequenos número (menos de 03 células) por campo de 40x	Células diferenciadas em médio número (mais de 03 células por campo de 40x)	Células diferenciadas em grande número (menos de 30 células por campo de 40x)	Células diferenciadas bundantes (mais de 30 células por campo de 40x)
GRANULOMA	Ausência	Esboço de granuloma	Granuloma de pequena amplitude	Granuloma de média amplitude	Granuloma de grande amplitude	
PLASMÓCITOS	Ausência	Escassos e difusos ou raros aglomerados	Alguns aglomerados ou infiltração difusa discreta	Moderadamente abundantes	Abundantes	Abundantíssimos
NECROSE aguda e/ou subaguda	Ausência	Lise focal discreta a moderada de macrófagos	Lise focal-confluyente acentuada de macrófagos	Necrose fibrinóide focal isolada	Necrose fibrinóide multifocal	Necrose fibrinóide focal-confluyente
FIBROSE	Ausência	Hiperplasia mínima de fibroblastos	Hiperplasia discreta de fibroblastos	Hiperplasia moderada de fibroblastos e/ou fibrose discreta	Hiperplasia acentuada de fibroblastos e/ou fibrose moderada	Fibrose acentuada
PARASITAS	Ausência	Escasso número (menos que 3 parasitos por campo)	Pequeno número (menos que 30 parasitos por campo de 40x)	Moderado número (mais que 30 parasitos por campo de 40x)	Acentuado número (mais que 300 parasitos por campo de 40x)	Acentuadíssimo número (mais que 3000 parasitos por campo de 40x)

Tabela 05 - Protocolo dos critérios histopatológicos para análise qualitativa dos casos (modificado de MAGALHÃES, 1997).

0	1	2a	2 b	2 c	3	4	5
Ausência de lesão ou lesão mínima	Reação Exsudativa Celular (REC)	Reação Exsudativa e Necrótica (REN)	Reação Exsudativa e Necrótico-Granulomatosa (RENG)	Reação Exsudativa e Granulomatosa (REG)	Reação Exsudativa e Sarcoidiforme (RES)	Reação Exsudativa e Tuberculóide (RET)	Reação Cicatricial (RC)

Tabela 06 - Classificação histopatológica (MAGALHÃES, 1997).

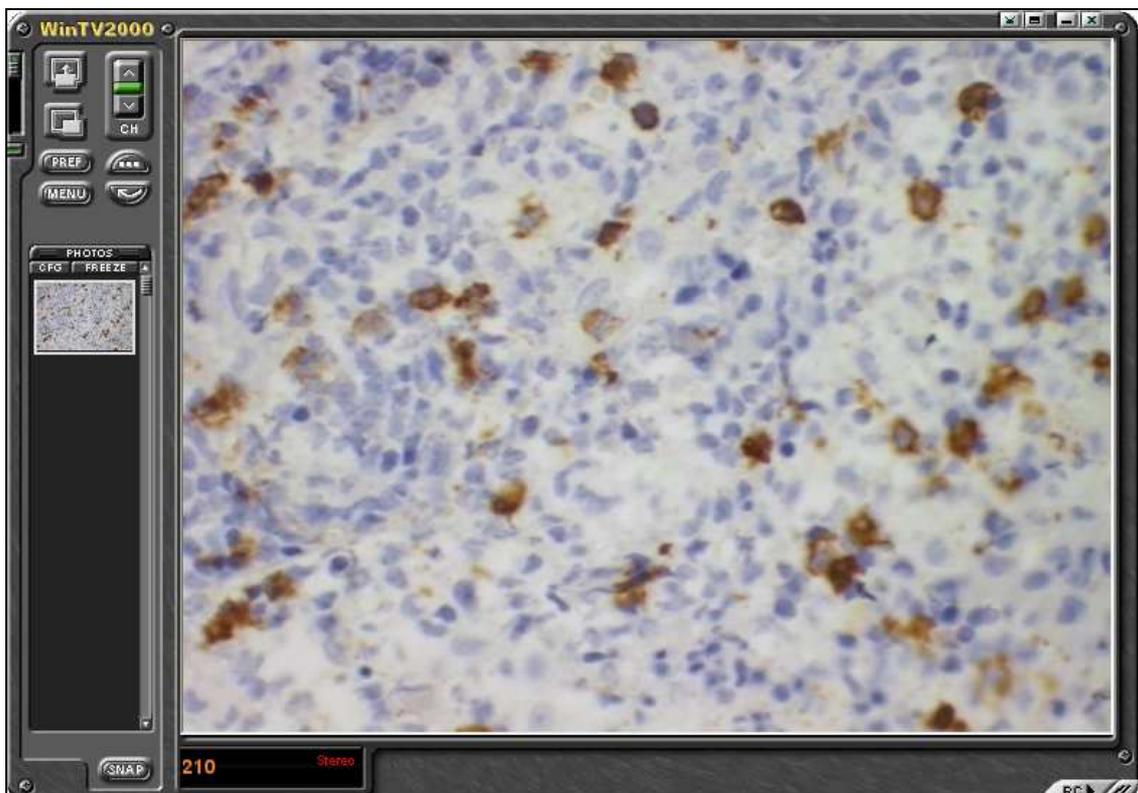


Figura 20 – Utilizando o captador de imagem e o programa WinTV2000K Versão 4.7.23045 (1998-2004). Campo de 400x com maior positividade celular para o CD15, neste exemplo, em uma área correspondente a $0,0432\text{mm}^2$.



Figura 21 - Utilizando o programa UnBvision. Carregada uma foto do caso CD15 e contadas as células positivas (em castanho) com auxílio do cursor. Na seta, caixa informando o número de células (corpos) positivas. Neste exemplo, 33 células.

Nº	PT	AP	Pront.	S	I	Nat.	Proc.	Profissão	Local da lesão	Sinais e sintomas	TE	LP de LTA	Tipo de lesão ORL	Local BX	IRM	IFA	E	C	IH	H	Tto.	FC	Comorbidades
1	JP	181/01	247385	M	65	MG	DF	aposentado	m.nasal e pele	rinorréia	12a	Cutânea há 5a.	infiltrada	m. nasal	20x15mm	N	N	*	P	GI	FMT	DM + HAS	
2	ARM	739/01	250723	F	46	PI	DF	do lar	m. nasal, palato mole e duro, lábios	obst. nasal, disfagia, rinorréia, epistaxe, febre e inapetencia	6m.	Mucosa há 4a.	infiltrada com ulceração e perfuração de septo nasal; lesão úlcero-infiltrativa em lábios; infiltração de palato mole e duro	m. labial	13x12mm	1/32	P	N	*	P	GI	FMI	Nega
3	AJS	742/01	250757	M	66	BA	DF	aposentado	mucosa nasal e palato mole	obst. nasal e disfagia	3a.	Cutânea há 40a.	infiltrada com ulceração e perfuração de septo nasal	mucosa (SOE)	20x15mm	1/20	*	*	*	P	GI	FMT	Chagas
4	RVS	2414/01	213552	F	26	MG	MG	do lar	m. nasal	rinorréia e epistaxe	4a.	Cutânea há 6m.	infiltrada com ulceração e perfuração de septo nasal	m. nasal	37x27mm	1/40	*	P	*	P	GI	FMT	Nega
5	DRC	2808/01	260802	M	67	MG	GO	pedreiro	m. nasal, palato mole e lábios,	obst. nasal, rinorréia, epistaxe, prurido, dor, edema, febre e eritema	1a.	Cutânea há 40 a.	infiltrada	palato mole	30x30mm	1/80	*	N	*	N	GI	FMT	HAS
6	ECJ	2548/02	276303	M	26	GO	DF	militar	m. nasal e palato mole	obst. nasal, rinorréia	3a.	*	infiltrada	palato mole	25X25mm	1/320	*	*	*	N	GI	FMI	Hepatite-B
7	JAF	1147/04	151911	M	61	GO	GO	lavrador	m. nasal e palato mole	obst. nasal, epistaxe, rouquidão, odinofagia, dor e edema	14a.	Cutânea há 6a	infiltrada com ulceração e perfuração de septo nasal	palato mole	*	*	*	*	N	GI	FMT	Malária + Tabagismo	
8	VDS	1179/04	345593	M	62	GO	DF	lavrador	m. nasal, palato mole e duro, laringe	obst. nasal, disfagia, rinorréia, epistaxe, odinofagia e dor	9m.	Cutânea	infiltrada com ulceração e perfuração de septo nasal	m. nasal	30x30mm	1\80	*	*	*	N	GI	FMT	Nega
9	CCSR	1909/04	312418	M	38	DF	DF	militar	m. nasal	obst. nasal	3m.	*	infiltrada com ulceração e perfuração de septo nasal	m. nasal	7x7mm	1\40	N	*	N	N	GII	FMI	Nega
10	DTB	279/05	368386	M	30	GO	GO	lavrador	m. nasal, palato mole e duro	disfagia, rouquidão, prurido e odinofagia	3a.	*	infiltrada com erosão	palato mole	*	1\80	P	N	N	P	GI	FMI	Nega
11	AAL	5149/05	265003	M	69	BA	TO	carpinteiro	m. nasal e pele	obst. nasal	1a	*	infiltrada com ulceração e perfuração de septo nasal; lesão ulcerada de pele	m. nasal	38X25mm	1/80	*	*	*	N	GI	FMC	Chagas
12	SNS	360/06	131914	M	48	BA	GO	serv. admn.	m. nasal	obst. nasal	*	*	infiltrada com ulceração e perfuração de septo nasal	m. nasal	15x15mm	N	*	*	*	N	GI	FMI	Nega
13	MRC	2429/06	50241	M	73	MT	DF	aposentado	m. nasal, palato mole e duro, lábios	obst. nasal, disfagia rinorréia e rouquidão	*	*	infiltrada com ulceração e perfuração de septo nasal	palato mole	9x9mm	1/80	N	N	*	N	GI	FMI	HAS
14	JB	5400/06	253817	M	53	TO	TO	lavrador	m. nasal	obst. nasal	4a.	Cutânea	infiltrada com ulceração	m. nasal	15x10mm	1\80	*	*	*	P	GI	FMT	Etilismo
15	JJS	241/07	222880	F	11	DF	DF	estudante	m. nasal	epistaxe e prurido	1m.	Cutânea há 3a.	infiltrada com ulceração	m. nasal	7x7mm	N	P	N	N	N	s/ tto.	FMT	Nega
16	JRS	1563/07	76379	M	45	MA	DF	lavrador	m. nasal, palato mole e pele	disfagia e rouquidão	2a.	Cutânea há 10a .	infiltrada com ulceração	palato mole	20x17mm	1\80	P	N	N	N	GI	FMC	AIDS (neuroTB) e Hepatite-B
17	MFCA	1611/07	81242	F	39	GO	DF	vendedora	m. nasal, palato mole e duro	obst. nasal	2a.	*	infiltrada com ulceração e perfuração de septo nasal	m. nasal	23x20mm	N	*	*	*	N	GI	FMI	Nega
18	JSD	2147/07	466925	M	75	TO	GO	lavrador	m. nasal	obst. nasal e disfagia	1a.	*	infiltrada com ulceração e perfuração de septo nasal	m. nasal	23x18mm	*	*	*	*	N	GI	FMI	HAS, Tabagismo e Etilismo

(Legenda: AIDS= Síndrome da Imunodeficiência Adquirida; AP=anatomopatológico; BA=Bahia; Bx=biópsia; C=cultura; DF=Distrito Federal; DM= Diabete Mellitus; E=esfregaço; F=feminino; FC=forma clínica; FMC=forma mucosa concomitante; FMI=forma mucosa indeterminada; FMT=forma mucosa tardia; GI=Glucantime; GO=Goiás; H=histopatologia; HAS= Hipertensão Arterial Sistêmica; I=idade (anos); IFA=imunofluorescência indireta; IH=inoculação em hamster; IRM=intradermorreação de Montenegro; LP=lesão prévia; M=masculino; MA=maranhão; MG=Minas Gerais; MT=Mato Grosso; N=negativo; P=positivo; PI=Piauí; PT=paciente; S=sexo; TE=tempo de evolução; TO=Tocantins; * =não consta)

Tabela 07 – Relação dos casos utilizados no estudo com dados clínicos e laboratoriais.

Nº	AP	Alterações epiteliais HIPERPLÁSICAS	Alterações epiteliais INFLAMATÓRIAS	INFILTRADO celular global	CÉLULAS MONONUCLEARES	MACRÓFAGOS vacuolizados	CÉLULAS EPITELIÓIDES	CÉLULAS DE LANGHANS	GRANULOMA	PLASMÓCITOS	NECROSE aguda e/ou subaguda	FIBROSE (Reação conjuntiva)	PARASITAS	CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	CLASSE HP
1	0181/01	X	5	5	3	0	0	0	0	3	0	1	2	1	REC
2	0739/01	1	4	3	3	0	3	4	3	3	3	2	2	2b	RENG
3	0742/01	4	2	4	4	0	0	0	0	4	0	2	1	1	REC
4	2414/01	1	1	2	2	0	0	0	0	2	0	1	1	1	REC
5	2808/01	1	1	3	3	0	0	0	0	2	3	1	0	2a	REN
6	2548/02	1	1	3	3	0	0	3	3	3	0	1	0	2c	REG
7	1147/04	3	3	4	3	0	0	0	0	3	0	1	0	1	REC
8	1179/04	3	3	5	4	0	0	0	2	3	1	2	0	2b	RENG
9	1909/04	5	4	3	2	0	0	0	0	2	0	4	0	1	REC
10	0279/05	4	2	4	3	0	0	0	0	3	0	1	1	1	REC
11	5149/05	4	3	3	3	0	0	0	0	3	0	1	0	1	REC
12	0360/06	1	4	2	2	0	0	0	0	1	0	4	0	1	REC
13	2429/06	2	3	5	3	0	0	0	0	2	0	0	0	1	REC
14	5400/06	4	4	4	3	0	0	0	0	3	0	2	1	1	REC
15	0241/07	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	REC
16	1563/07	2	3	4	4	0	0	0	2	3	3	1	0	2b	RENG
17	1611/07	4	4	5	4	0	0	1	2	3	3	1	0	2b	RENG
18	2147/07	4	4	5	4	0	0	0	0	3	0	1	0	1	REC

(Legenda: AP=anatomopatológico; HP= histopatológica; REC= reação exsudativa celular; REG= reação exsudativa granulomatosa; REN= reação exsudativa necrótica; RENG= reação exsudativa necrótico-granulomatosa; X=não aplicável).

Tabela 08 – Relação dos casos com os índices dos critérios histopatológicos numa avaliação qualitativa.

N.º	AP	CD45ro	CD20	CD8	CD68	CD15	Bcl2	CD4e*	CLASSE HP
1	181/01	2372,69	277,78	972,22	474,54	497,69	717,59	1400,46	REC
2	739/01	6134,26	428,24	1018,52	1111,11	335,65	1412,04	5115,74	RENG
3	742/01	6134,26	879,63	3113,43	1747,69	185,19	1828,70	3020,83	REC
4	2414/01	3229,17	1006,94	914,35	428,24	104,17	2141,20	2314,81	REC
5	2808/01	5960,65	486,11	2870,37	729,17	127,31	1481,48	3090,28	REN
6	2548/02	2615,74	1898,15	2071,76	347,22	231,48	2800,93	543,98	REG
7	1147/04	6307,87	57,87	1273,15	1574,07	208,33	914,35	5034,72	REC
8	1179/04	3414,35	1620,37	775,46	659,72	381,94	2384,26	2638,89	RENG
9	1909/04	1574,07	196,76	162,04	127,31	266,20	1134,26	1412,04	REC
10	279/05	3807,87	810,19	2291,67	289,35	150,46	2141,20	1516,20	REC
11	5149/05	X	X	X	X	X	X	X	REC
12	360/06	3148,15	185,19	983,80	405,09	254,63	636,57	2164,35	REC
13	2429/06	6365,74	115,74	2106,48	1458,33	405,09	1539,35	4259,26	REC
14	5400/06	4444,44	2615,74	1250,00	1666,67	289,35	1851,85	3194,44	REC
15	241/07	X	X	X	X	X	X	X	REC
16	1563/07	3113,43	567,13	2523,15	2083,33	462,96	1597,22	590,28	RENG
17	1611/07	5081,02	2650,46	2673,61	1435,19	416,67	1863,43	2407,41	RENG
18	2147/07	3668,98	1354,17	2743,06	787,04	243,06	1736,11	925,93	REC

(Legenda: AP=anatomopatológico; HP=histopatológica; REC=reação exsudativa celular; REG= reação exsudativa granulomatosa; REN= reação exsudativa necrótica; RENG= reação exsudativa necrótico-granulomatosa; X = casos com material insuficiente para estudo imuno-histoquímico).

Tabela 09 - Relação dos perfis imuno-histoquímicos dos casos com o número de células positivas/mm² e o CD4e* (CD4 estimado) numa avaliação quantitativa.

Classes	REC	RENG	REG	REN
CD45ro	4104 (±1685,2)	4435 (±1425,2)	5960 (0)	2615 (0)
CD20	749 (±793,1)	1316 (±1036,2)	486 (0)	1898 (0)
CD8	1580 (±935,0)	1747 (±989,2)	2870 (0)	2071 (0)
CD68	895 (±641,3)	1322 (±598,8)	729 (0)	347 (0)
CD15	260 (±116,9)	398 (±53,7)	127 (0)	231 (0)
Bcl2	1463 (±570,9)	1814 (±422,6)	1481 (0)	2800 (0)
CD4e*	2523 (±1343,7)	2687 (±1859,5)	3090 (0)	543 (0)

Tabela 10 – Média de células positivas/mm² e desvio padrão em relação aos marcadores nas classes histopatológicas.

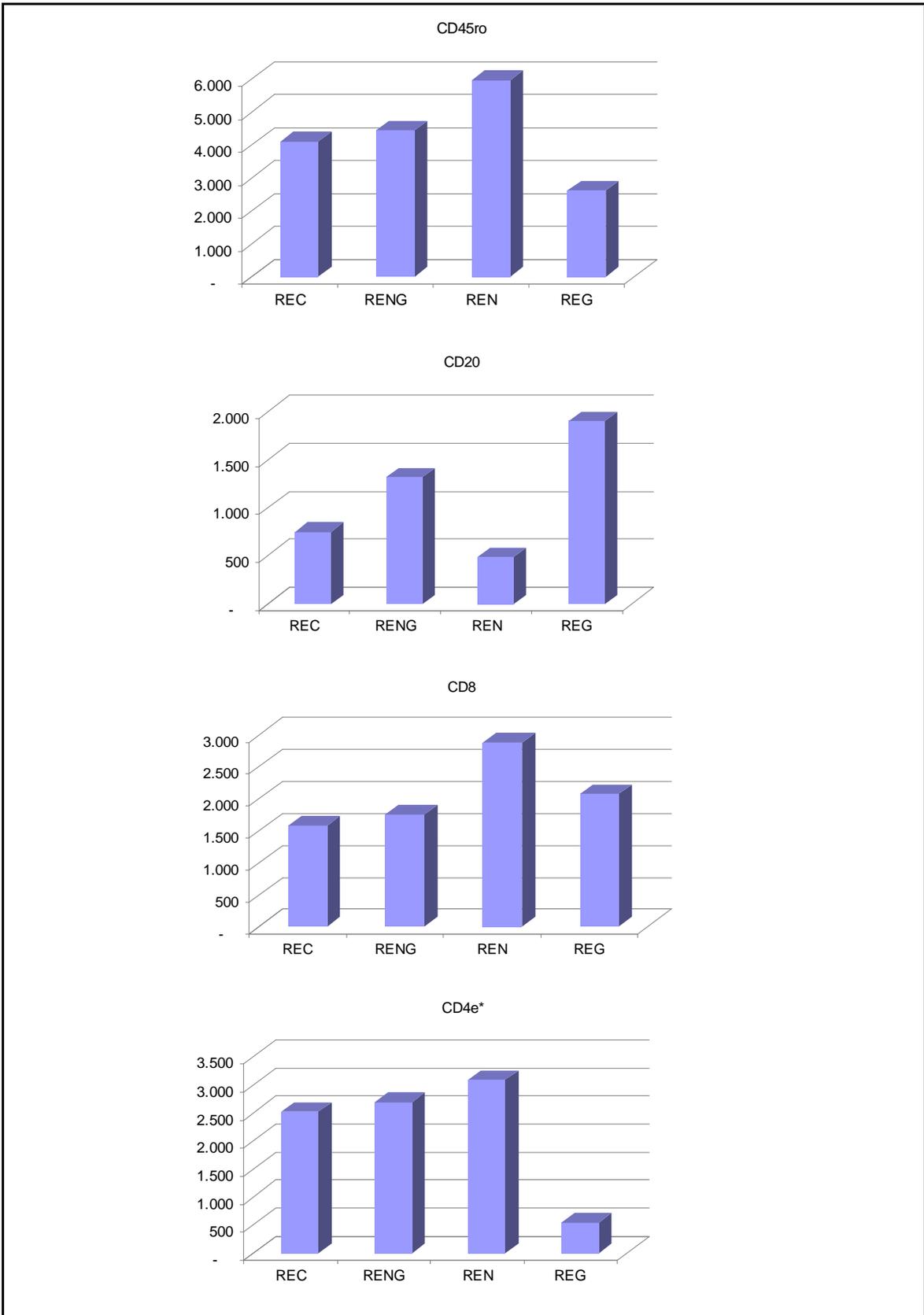


Gráfico 19– Distribuição da média do número de células/mm² por marcadores celulares linfocitários nas classes histopatológicas.

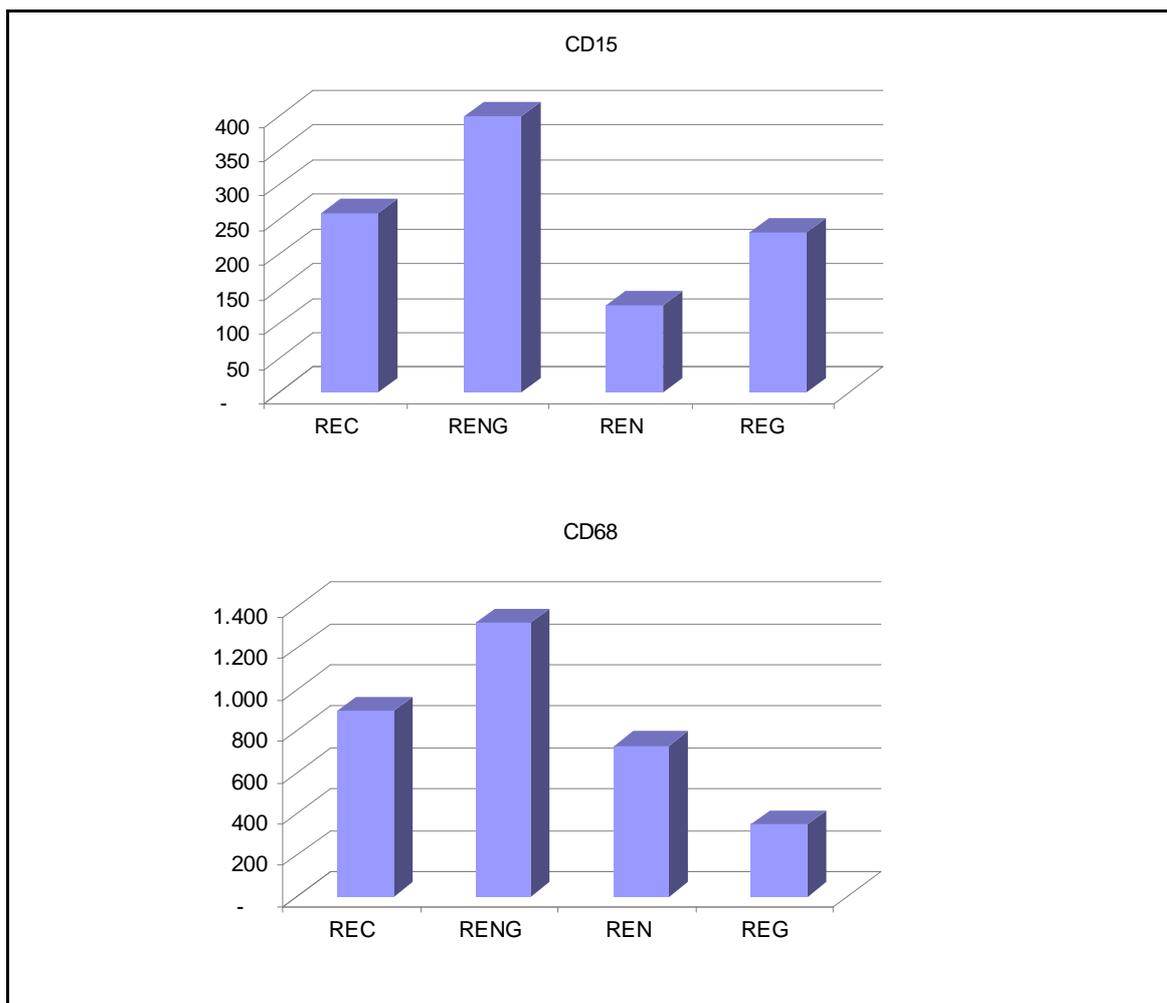


Gráfico 20 – Distribuição da média do número de células/mm² por marcador celular de neutrófilos (CD15) e macrofágico (CD68) nas classes histopatológicas.

Anticorpos	Clones	Diluição	Código	Fabricante
CD45ro	UCHL1	1:100	M-0742	Dako
CD20CY	L26	1:200	M - 0755	Dako
CD8	C8/144B	1:100	M-7103	Dako
CD4 Ab-8	1F6	1:80	MS392S	Neomarkers
CD68	PG-MI	1:100	M-0876	Dako
CD15	C3D-1	1:100	M-0733	Dako
Bcl-2 oncoprotein	124	1:100	M-0887	Dako

Tabela 11 – Anticorpos e seus respectivos clones, diluições, códigos e fabricantes utilizados nas reações imuno-histoquímicas.

FORMA MUCOSA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DE CASOS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA.

Marco Aurélio da Silva Peixoto & Albino Verçosa de Magalhães

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença parasitária endêmica em mais de setenta países no mundo: 90% dos casos ocorrem em países da América do Sul, África e Ásia. É causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada de diversas espécies de flebotomíneos. Caracteriza-se pelo comprometimento de pele, mucosas e, raramente, linfonodos, com manifestações clínicas diversas, o que dificulta sobremaneira o diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; REITHINGER et al., 2007).

No Brasil, as três principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MEDEIROS & ROSELINO, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Sendo que a forma mucosa é causada principalmente pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*, com distribuição abrangente no Brasil, compreendendo a Amazônia, regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país.

FORMAS MUCOSAS

O envolvimento mucoso na LTA é incomum e resulta da disseminação hematogênica ou linfática de amastigotas da pele para mucosa nasal, oral, orofaringe e laringe. Na maioria dos casos, a forma mucosa da LTA torna-se evidente depois de alguns anos de resolução de uma lesão cutânea prévia, mas também pode ocorrer enquanto lesões na pele ainda estão presentes (DA-CRUZ et al., 2002; MOTTA et al., 2007).

As formas mucosas reconhecidas são a primária, tardia, indeterminada, contígua e concomitante (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

Na forma primária, a lesão de mucosa é causada diretamente pela picada do mosquito, sendo então restrita às possibilidades de lesões localizadas em lábios e genitais. A forma mucosa tardia ocorre quando há comprometimento da mucosa anos após o surgimento da lesão cutânea. A forma mucosa indeterminada não é precedida de manifestação clínica cutânea prévia, sendo então a primeira manifestação da LTA mucosa. Na forma contígua, o envolvimento da mucosa ocorre em decorrência da expansão de uma lesão cutânea pré-existente e na forma mucosa concomitante há aparecimento simultâneo da lesão mucosa quando existe uma lesão cutânea ativa (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Leishmania: ANTÍGENOS SECRETADOS E NÃO SECRETADOS.

A *Leishmania* dentro do hospedeiro possui um conjunto de antígenos que afetam o sistema imune e a produção de citocinas, facilitando a perpetuação do processo infeccioso. Dois grupos de moléculas parasitárias estão envolvidos nesse processo: as moléculas secretadas/superfície e as não secretadas/intracelulares, sendo as primeiras moléculas as principais determinantes dos mecanismos invasivos/evasivos (SANTARÉM et al., 2007).

As moléculas de superfície/secretadas incluem o lipofosfolídeo glicocjugado (LPG), na protease de superfície promastigota glicoproteína 63 (gp63), nos fosfolípidos glicosilinositol (GIPLs), nas peptidases cisteínicas, proteases β -mercaptoetanol ativadas, fosfatases e quitinases. Dentre os antígenos não secretados, designados como panantígenos, destacam-

se as histonas, proteínas de choque térmico e proteínas ribossômicas. (SANTARÉM et al., 2007).

Enquanto os antígenos de superfície são responsáveis no desenvolvimento de uma resposta imune celular (células T e macrófagos), os antígenos não secretados parecem estar envolvidos no desenvolvimento de uma resposta humoral exuberante, mediada por anticorpos (SANTARÉM et al., 2007).

IMUNOPATOLOGIA

Após inoculação das formas promastigotas de *Leishmania* na pele, pelos vetores, há desencadeamento de uma resposta com fatores séricos (sistema complemento) e inflamatória aguda inespecífica celular (polimorfonucleares neutrófilos, células *natural killer* e macrófagos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As formas metacíclicas promastigotas de *Leishmania* ativam o sistema complemento, tanto pela via clássica quanto alternativa, com opsonização, formação do complexo de ataque à membrana C5b-C9e e conseqüente lise, de forma rápida, dos parasitas. Isto resulta na morte de aproximadamente 90% dos parasitas inoculados no prazo de 3 minutos (STEBUT, 2007).

A opsonização por C3bi também permite adesão aos receptores complementênicos (CR) 1 dos eritrócitos (aderência imune), permitindo uma disseminação local no tecido e para outros sítios mais distantes (STEBUT, 2007).

Os polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) são as primeiras células a migrarem ao local de infecção ou de lesão tecidual, funcionando como células efetoras e fagocíticas primárias. As formas promastigotas da *Leishmania* são capazes de liberarem o LCF (*Leishmania chemotatic fator*), um fator potente quimiotático de neutrófilos. Uma vez ingeridas, as partículas estranhas são destruídas por enzimas proteolíticas contidas nos grânulos citoplasmáticos e pela produção de radicais de oxigênio. Em seqüência, há produção neutrofílica de IL-8 com recrutamento de mais neutrófilos para o local da infecção (AWASTHI et al., 2004).

Os PMNs podem ser divididos em células CD28⁺ ou CD28⁻ (CD – *cluster of differentiation*), sendo que os primeiros têm a capacidade de interagir com CD80/86 dos macrófagos induzindo produção de INF- γ e fatores quimiotáticos de células T. Tendo assim ação inicial de começar a resposta imune de células T contra a *Leishmania* (VENUPRASAD et al., 2002).

Dois a três dias mais tarde, há entrada de monócitos e macrófagos no local do processo inflamatório, pela produção de quimiocinas indutoras *macrophage inflammatory protein-1alfa* (MIP-1 α) e MIP-1 β . Os macrófagos fagocitam os PMNs infectados pela identificação de fosfatidil na superfície das células inflamatórias, assim não há ativação das funções antimicrobianas dos macrófagos, sendo uma via ideal e silenciosa de entrada da *Leishmania* nas células do hospedeiro (AWASTHI et al., 2004).

Os macrófagos apresentam várias funções: permitem a replicação do parasita, mas também funcionam como apresentadoras de antígenos (APCs) e fonte de citocinas que modulam a resposta imune mediada pelas células T (TEIXEIRA et al., 2006).

As duas principais moléculas de superfície da *Leishmania*, LPG e gp63, em contato com as frações C3b e C3bi do sistema complemento, interagem com CR1 e CR3 da superfície de macrófagos. Isso permite a

internalização do parasita no macrófago (LODGE & DESCOTEAUX, 2005).

As formas promastigotas aderem aos macrófagos através destes receptores e são internalizadas em um fagossomo que funde com o lisossomo para formar o fagolisossomo ou vacúolo parasitóforo. Uma vez dentro do macrófago, a forma promastigota sofre mudanças bioquímicas e metabólicas culminando na forma de parasita intracelular obrigatório: a amastigota. Estas serão liberadas pela lise macrofágica e podem invadir novamente células dendríticas (DCs), fibroblastos e outros macrófagos (HANDMAN & BULLEN, 2002).

Primariamente, os macrófagos tentam eliminar a *Leishmania* através de metabólitos tóxicos do oxigênio, como ânion óxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) (AWASTHI et al., 2004). Posteriormente, os macrófagos ativados produzem diferentes citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-18, IL-12, IL-6 e INF- γ . (AWASTHI et al., 2004).

Outras células adjuvantes na resposta imune inata são as DCs e as células NK (TEIXEIRA et al., 2006).

As DCs são potentes APCs e podem induzir eficientemente a ativação de células T. Além do que, são também fonte de diferentes citocinas como IL-12, IL-10 e INF- γ (TEIXEIRA et al., 2006).

As células NK chegam ao local da infecção nas primeiras 24 horas. Elas têm com ação citotóxica e, além disso, são fontes primárias INF- γ , ajudando a desenvolver uma resposta imune protetora (TEIXEIRA et al., 2006).

Está bem documentado que as células T podem se diferenciar em células efetoras tipo Th1 e Th2. Muitos estudos tentaram definir o paradigma Th1/Th2 de resistência/ susceptibilidade à infecção e o papel das IL-12 e IL-4. (AWASTHI et al., 2004; ALEXANDER & BRYSON, 2005).

A IL-4 é conhecida por induzir a diferenciação Th2, enquanto a IL-12 induz a Th1 (AWASTHI et al., 2004).

A secreção de IL-12 pelas DCs ajuda a direcionar uma imunidade celular protetora com a ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺. Essas células efetoras circulantes são recrutadas para os locais de infecção na pele através de mecanismos de adesão, moléculas e citocinas, com posterior afluxo de monócitos circulantes para uma resposta inflamatória local direta, incluindo a formação de granulomas e o desenvolvimento da lesão. Resposta predominante com células T CD4⁺ Th1 é associada com ativação macrofágica induzida por INF- γ indicando uma via em que a IL-12 modula a resposta imune básica, além de outras citocinas adjuvantes como a IL-2 e TNF. As células T CD8⁺ também produzem INF- γ e promovem o desenvolvimento da subpopulação de células T CD4⁺ Th1 e resolução da doença (MURRAY et al., 2005).

Num ambiente inflamatório, mecanismos contrabalanceadores normalmente ocorrem para alterar o processo. Na LTA, há ação e geração de citocinas supressoras. Citocinas associadas a uma resposta Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13) e *transforming growth factor* β (TGF- β) são capazes de desregular a resposta imune Th1 e inativarem macrófagos. Dessa forma, moderam injúria tecidual, mas promovem a persistência da infecção intracelular (MURRAY et al., 2005).

HISTOPATOLOGIA E OS PADRÕES DE REAÇÃO

Em biópsias, coradas pela técnica da hemotoxilina-eosina (HE), formas amastigotas são visualizadas como pequenos elementos ovalados ou piriformes, com citoplasma claro, núcleo discretamente basófilo e cinetoplasto puntiforme ou em forma de barra, também basófilo. Elas são encontradas em meio às células inflamatórias e dentro do citoplasma de

macrófagos/DCs, onde podem ter sua forma não tão bem definida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

De forma geral, o quadro histopatológico da LTA está representado por um infiltrado celular histiocitoplasmocitário (padrão exsudativo celular), acompanhado por uma reação granulomatosa que pode surgir associada ou não à necrose (MAGALHÃES, 1986).

Dos padrões histopatológicos presentes na LTA, o exsudativo celular constitui o primeiro padrão de reação à presença do parasito no tecido, pois seus tipos celulares são verificados em maior ou menor proporção nos demais padrões (MAGALHÃES, 1986).

Na interação *Leishmania*/hospedeiro, percorre uma resposta imune celular e humoral, com desenvolvimento de mecanismo necrosante, lise intracelular e granulomas organizados (hipersensibilidade do tipo tardia). Com a necrose, há produção de um granuloma organizado com células gigantes e epitelióides. Na baixa carga antigênica, o mecanismo de necrose é dependente da presença plasmócitos e linfócitos, que são recrutadas para a imunidade celular e humoral (RIDLEY, 1979)

Como constatou MAGALHÃES (1986), sistematicamente, na forma cutânea da LTA, são descritos os seguintes padrões de reação:

a) Ausência de lesão ou lesão mínima: sem infiltrado inflamatório significativo ou granulomas.

b) Reação exsudativa celular (REC): infiltrado histiocitoplasmocitário do córion da mucosa com proporções celulares que tendem para a equivalência.

c) Reação exsudativa celular e necrótica (REN): necrose tissular de amplitude e formato variáveis associada à vasculite aguda, no seio do infiltrado histiocitoplasmocitário.

d) Reação exsudativa e necrótico-granulomatosa (RENG): reação granulomatosa desorganizada nas proximidades de área de necrose tissular, com presença de células gigantes, macrófagos ativados e infiltrado histiocitoplasmocitário associado.

e) Reação exsudativa e granulomatosa (REG): reação granulomatosa desorganizada sem a presença de necrose tissular, no seio do infiltrado histiocitoplasmocitário;

f) Reação exsudativa e sarcoidiforme (RES): granulomas com células epitelióides, bem formados e organizados, semelhantes aos encontrados na Sarcoidose

g) Reação exsudativa e tuberculóide (RET): granulomas organizados com células epitelióides, células gigantes tipo Langhans e coroa linfocitária externa, semelhantes aos encontrados na Tuberculose.

h) Reação cicatricial (RC): reação observada após a cura clínica com presença de escassos linfócitos em meio à fibrose no córion.

APÓTOSE E LEISHMANIOSE

Apoptose ocorre em numerosos eventos fisiológicos e patológicos e trata-se da morte celular programada pela ação de enzimas que degradam o DNA celular e as proteínas plasmáticas. Não há desencadeio de processo inflamatório porque a membrana celular permanece intacta, mas a estrutura celular é alterada. Ocorrem retração celular, condensação e marginação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (KUMMAR et al., 2005).

Duas vias moleculares distintas e convergentes são responsáveis pela apoptose: a extrínseca e intrínseca. Elas resultam na ativação da cascata das caspases, que são as proteases que atuam em uma série de proteínas celulares e, portanto, responsáveis pelas alterações morfológicas características da apoptose (KUMMAR et al., 2005).

Na LTA, assim como em outras doenças parasitárias, a apoptose pode ser induzida tanto nos parasitas quanto nas células da resposta imune do

hospedeiro. Os mecanismos envolvidos em espécies do gênero *Leishmania*, bem como a importância desse evento na patogênese da doença, ainda não estão bem definidos (NGUEWA et al., 2004).

IMUNO-HISTOQUÍMICA

Neste estudo foi realizado o seguinte perfil imuno-histoquímico: CD45ro, CD20, CD68, CD15, CD4, CD8 E Bcl-2. Para cada anticorpo foi utilizado controle para verificar o funcionamento da reação em tonsilas palatinas.

OBJETIVOS

Descrever casos de pacientes com a forma mucosa da LTA, atendidos nos ambulatórios do HuB. Analisar dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, porém correlacionando com os aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra de conveniências, não probabilística, que teve como fonte de dados casos de pacientes atendidos no ambulatório do HuB de ambos os sexos entre 2001 e 2007.

Na descrição dos casos foram observados: nome (sigla), idade, naturalidade, procedência, profissão, tipo e localização da lesão, dados clínicos (sinais, sintomas, histórico de tratamentos e de lesões), tempo de evolução, exame ORL, métodos laboratoriais de diagnóstico (intradermoreação de Montenegro, imunofluorescência indireta, cultura, inoculação em *hamster* e esfregaço), comorbidades, tratamento e evolução clínica.

Para inclusão dos casos neste estudo existiu a ocorrência de pelo menos um dos seguintes critérios:

- a) Identificação da *Leishmania* na histopatologia, esfregaço, cultura e/ou inoculação em *hamster*;
- b) IRM reator e/ou IFA reagente com histopatologia compatível e início de tratamento para LTA;
- c) Forma cutânea pregressa de LTA tratada ou não com lesão mucosa ativa.

Foram excluídos casos de pacientes:

- a) sem identificação de *Leishmania*, por métodos histopatológicos e/ou parasitológicos. Mesmo os pacientes com IRM e/ou IFA suspeito para LTA, mas sem início de tratamento pelo médico assistente.
- b) com comorbidades, sem identificação de *Leishmania*, por métodos histopatológicos e/ou parasitológicos, mesmo com IRM e/ou IFA suspeito para LTA, mas sem tratamento clínico. Isso por existir a possibilidade de dúvida no diagnóstico ou tratar-se de possível reação cruzada.
- c) com material insuficiente para novos cortes e realização das reações imuno-histoquímicas.

Finalmente, foram incluídas dezoito biópsias para análise histopatológica.

Nos recortes para as reações imuno-histoquímicas, duas biópsias (5149/05 e 241/07) não tiveram material suficiente para as reações e foram incluídas somente na análise histopatológica.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os casos foram analisados em microscopia óptica de cortes histológicos de 4µm corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). Foram realizadas as colorações histoquímicas de PAS (ácido periódico de Schiff) com diastase e Fite-Faraco para descartar a presença de fungos e bacilos álcool ácido resistentes. A análise histopatológica foi feita seguindo os critérios modificados utilizados por MAGALHÃES (1997).

A análise qualitativa das alterações histopatológicas compreende o total de onze critérios: alterações epiteliais hiperplásicas, alterações epiteliais inflamatórias, infiltrado celular global, células

mononucleares, macrófagos vacuolizados, células epitelióides, granuloma, plasmócitos, necrose aguda e/ou subaguda, fibrose e a presença do parasita.

ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Na análise quantitativa da expressão imuno-histoquímica dos marcadores celulares, para cada caso e cada marcador, a lâmina foi fotografada com auxílio do programa WinTV2000K Versão 4.7.23045 (1998-2004) em dois campos aleatórios de 400x com maior positividade celular (*hot spot*) e distante das áreas de ulceração, com captador de imagens em uma área correspondente a 0,0432mm² cada campo. As duas fotos foram armazenadas para cada caso e cada marcador.

Utilizando o programa UnBvision (HORITA, 2001), foi carregada uma foto por vez e com auxílio do cursor foram contadas manualmente as células positivas coradas em castanho. Esses dois valores foram somados, correspondendo ao número de células em duas fotos, ou seja, 2x0,0432mm². Convertem-se esse valor para uma área padrão de 1 mm² para expressar o número de células positivas.

TÉCNICA DAS REAÇÕES

A técnica de imuno-histoquímica utilizou o Kit Estreptavidina Peroxidase, da Dako Cytomation e Neomarkers:

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os achados demográficos, clínicos, laboratoriais e histopatológicos foram analisados do ponto de vista descritivo. Enquanto nas classes histopatológicas e nos achados imuno-histoquímicos foram aplicados testes não paramétricos, além de uma análise descritiva.

Devido ao número pequeno de amostras, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon para analisar os marcadores e as classes por serem grupos pareados, ou seja, os marcadores são dependentes dentro de cada caso e são mensurados em cortes histológicos semelhantes.

Relacionando os achados histopatológicos (granuloma e parasitas) e o contato prévio com antimonial pentavalente com os resultados do perfil imuno-histoquímico, utilizou-se o teste de Mann Whitney U, um teste não paramétrico para analisar grupos não pareados.

Para todos os testes adotou-se o valor de significância estatística menor a 5% (p<0,05).

RESULTADOS

Dos pacientes do estudo, quatorze são do sexo masculino (77,78%) e quatro do sexo feminino (22,22%), com idade variando de 11 a 75 anos. As profissões foram variadas com maior frequência da atividade de lavrador (33,33%), sendo todos esses do sexo masculino.

A naturalidade é de maioria do estado de Goiás (27,78%), seguido de Minas Gerais e Bahia (16,67% cada), Tocantins e Distrito Federal (11,11% cada) e ainda do Maranhão, Piauí e Mato Grosso (5,56% cada). Já a procedência se concentra em quatro regiões: Distrito Federal (55,56%), Goiás (27,78%), Tocantins (11,11%) e Minas Gerais (5,56%).

Os dados clínicos dos pacientes foram analisados sumariamente. Todos os casos tiveram comprometimento da mucosa nasal, seguida pelo palato mole e duro, mucosa labial e também da laringe; dois pacientes apresentavam lesão de pele ativa concomitante com a lesão de mucosa. Em relação aos sinais e sintomas que foram referidos durante as consultas, a obstrução nasal foi a queixa mais frequente (25%), além de disfagia e rinorréia (13,46% cada).

Ao exame ORL, a lesão infiltrada com ulceração e perfuração do septo nasal foi a mais

comumente encontrada (61,11%), seguida das lesões infiltradas com ou sem ulceração (16,67% cada) e infiltrada com erosão (5,56%). Analisando os prontuários, as formas clínicas da LTA mucosa encontradas foram: indeterminada (44,44%), tardia (38,89%), e concomitante (16,67%); não se verificou a forma primária e contígua.

As comorbidades dos casos foram diversas, ocorrendo desde doenças infecciosas e parasitárias, como Chagas e Malária, até outras como Diabetes Mellitus e Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS).

Os exames laboratoriais complementares realizados foram a IRM, IFA, cultura, esfregaços e inoculação em *hamster*, mas nem sempre em todos os casos.

A IRM foi realizada em dezesseis pacientes sendo positivo (maior que 5mm) em todos eles, com uma das dimensões variando de 7 a 38mm.

Os resultados da primeira IFA foram analisados no estudo. Em 12 dos 16 pacientes em que ela foi encontrada, a titulação variou de 1/20 a 1/320, sendo que a titulação 1/80 a mais freqüente (7 casos). Em dois casos não foram encontrados dados referentes à primeira IFA.

A inoculação em *hamster* foi aplicada em 4 casos, mas em nenhum deles foi identificado *Leishmania* por esse método. Desses 4 casos, 3 tiveram demonstração do parasita pelo esfregaço. No outro caso, foi negativa a pesquisa do parasita pelos dois outros métodos: esfregaço e cultura. Em um caso em que a cultura foi positiva para *Leishmania* não foram realizados esfregaços e nem inoculação para comparar estes métodos.

As biópsias dos pacientes (Figura 1) foram realizadas principalmente na mucosa nasal (55,56%) e no palato mole (33,33%), além dos lábios (5,56%).

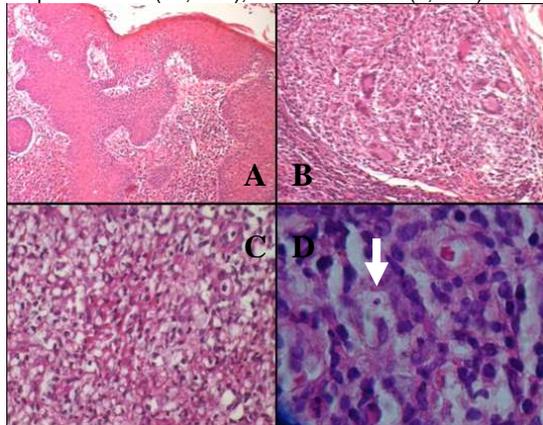


Figura 1 – Fotomicrografias de alterações hiperplásicas do epitélio (A), granuloma (B), necrose aguda (C) e demonstração da *Leishmania* - seta (D).

As alterações epiteliais incluem as hiperplásicas (AEH) e inflamatórias (AEI) e todos os casos tiveram algum índice de alteração nesses critérios.

Nas alterações tissulares, as células mononucleares e os plasmócitos foram os tipos celulares mais encontrados em diferentes índices. O granuloma foi identificado em cinco casos, sendo que três deles foram encontradas células gigantes multinucleadas, tipo Langhans. Em nenhum dos casos foi encontrado macrófagos vacuolizados.

Nas alterações tissulares adaptativas/inflamatórias, a fibrose foi a alteração mais comumente encontrada nos casos, com índice variando de 0 a 4. Ela inicia-se com formação de traves de tecido conjuntivo em direção a cicatrização da lesão com amplas áreas de colágeno e alguns vasos residuais. A necrose foi identificada no seio do infiltrado inflamatório em área com formação de uma malha delicada de fibrina que tem maior afinidade à eosina na coloração de HE.

De maneira geral, a demonstração da *Leishmania* foi feita em 44,44% dos casos seja através da histopatologia ou por algum método parasitológico. Na histopatologia do estudo, a identificação de *Leishmania* foi possível em 33,33% dos casos.

Algum método parasitológico foi aplicado em nove casos para identificação de *Leishmania* e confrontando com o resultado do estudo histopatológico destes casos percebe-se que em seis deles foi encontrado o parasita (66,66%). Desses casos em que os parasitas foram encontrados, em três a pesquisa foi positiva no método parasitológico, em dois em ambos os métodos e em um somente na histopatologia. Dez pacientes tinham relato de contato prévio em tratamento da forma cutânea pregressa da LTA. Desses, em sete a pesquisa para *Leishmania* foi positiva; já nos oito outros casos sem história de contato prévio com o antimonial, apenas em um se encontrou o parasita.

A classificação histopatológica mais freqüente foi a REC (66,67% - 12 casos), seguida das formas RENG (22,22% - 4 casos), REN (5,56% - 1 caso) e REG (5,56% - 1 caso). Em relação às formas clínicas, a classe REC ocorreu em todas as formas clínicas existentes no estudo, sendo também a mais comumente encontrada na tardia e indeterminada. As únicas classes REN e REG foram encontradas, respectivamente, nas formas clínicas tardia e indeterminada.

No córion, o infiltrado inflamatório das biópsias dos casos de LTA mucosa tiveram alguma positividade para todos os marcadores CD45ro, CD20, CD8, CD15, CD68 e Bcl-2 (Tabela 1 e Figura 2).

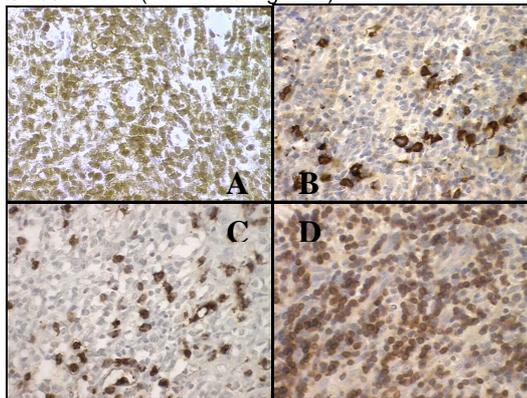


Figura 2 - Fotomicrografias de reações imuno-histoquímicas para o CD45ro (A - caso 17: RENG), CD20 (B - caso 3: REC); CD15 (C - caso 5: REN) e Bcl-2 (D - caso 2: RENG).

O marcador CD4 não obteve um padrão de reação satisfatório e não pode ser analisada *in situ* nas biópsias. As reações foram repetidas outras vezes, mas ocorreram áreas de reação inespecífica. Para tentar realizar a estimativas das células positivas para esse marcador foi subtraído o número de células positivas para CD45ro das outras positivas para o CD8, para ter um número estimado de células T CD4⁺ (CD4e*), para que fosse possível fazer uma relação de número de células T CD8⁺/CD4⁺ nas variáveis do estudo.

Classes	REC	RENG	REG	REN
CD45ro	4104 (±1685,2)	4435 (±1425,2)	5960 (0)	2615 (0)
CD20	749 (±793,1)	1316 (±1036,2)	486 (0)	1898 (0)
CD8	1580 (±935,0)	1747 (±989,2)	2870 (0)	2071 (0)
CD68	895 (±641,3)	1322 (±598,8)	729 (0)	347 (0)
CD15	260 (±116,9)	398 (±53,7)	127 (0)	231 (0)
Bcl2	1463 (±570,9)	1814 (±422,6)	1481 (0)	2800 (0)
CD4e*	2523 (±1343,7)	2687 (±1859,5)	3090 (0)	543 (0)

Tabela 1 - Média de células positivas/mm² e desvio padrão em relação aos marcadores nas classes histopatológicas.

Analisando a quantidade total de todas as células em relação às classes encontradas ($p < 0,05$), as classes histopatológicas são reconhecidas estatisticamente diferentes entre si, exceto quando relacionado à REG e a REN.

De forma geral, o infiltrado inflamatório é mais rico em linfócitos T (células CD45ro positivas) do que linfócitos B (células CD20 positivas). Além disso, estima-se que há maior proporção de linfócitos T CD4⁺ em todas as classes da forma mucosa da LTA, exceto no único exemplo da classe REG em que houve predomínio de linfócitos T CD8⁺.

A quantidade de polimorfonucleares neutrófilos (células CD15 positivas) em cada classe é muito baixa. Os macrófagos (células CD68 positivas) tiveram proporções próximas, sendo a maior na classe RENG. O Bcl-2 teve expressão em todas as classes, com maior número de células marcadas pelo na classe REG. Houve principalmente marcação de linfócitos do infiltrado inflamatório.

História de contato prévio com o antimonial pentavalente, presença de granulomas ou parasitas identificados ao exame histopatológico não foram critérios estatisticamente significativos ($p > 0,05$) para relacionar a existência das diferenças entre os números de células positivas/mm² em relação a todos os marcadores da imuno-histoquímica.

DISCUSSÃO

No estudo, foram analisados casos da forma mucosa da LTA no HuB, correlacionando dados clínicos e laboratoriais com os achados histopatológicos e imuno-histoquímicos.

Uma limitação deste estudo foi a não identificação da espécie de *Leishmania* dos casos estudados. Sabe-se que espécies diferentes podem produzir formas clínicas e padrões histopatológicos diferentes. Entretanto, de acordo com outros estudos, nas regiões de onde procederam os pacientes há predomínio de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, além do próprio tropismo dessa espécie para as mucosas nasais (SAMPAIO & PAULA, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Foram analisados 18 casos da forma mucosa da LTA que foram atendidos no ambulatório do HuB, no período compreendido entre o ano de 2001 e 2007. A maioria dos casos foi do sexo masculino (77,78%) e com atividade ligada à zona rural, sendo a profissão de lavrador (33,33%) a mais predominante. A média de idade dos pacientes do estudo foi de 50 anos, variando de 11 a 75 anos. A existência de crianças reforça a hipótese de transmissão peridomiciliar em áreas periurbanas (SAMPAIO & PAULA, 1999).

A maioria dos casos foi concentrada na região Centro-Oeste, confirmando, de acordo com dados do Ministério da Saúde, esta região como a segunda em incidência de casos de LTA no Brasil: 33,30 casos/100mil habitantes no ano de 2005 (www.datasus.gov.br). O HuB atrai pacientes de outros estados vizinhos, principalmente da região Norte e Nordeste. Isso não se deve somente pela sua localização na região central do Brasil, mas também por motivos históricos e por ser reconhecido como um centro de referência e de excelência no tratamento da LTA. Além disso, a existência de casos naturais e procedentes do próprio Distrito Federal já condiz com a realidade de casos de LTA ocorrido nessa região como relatado por SAMPAIO & PAULA (1999). Nesse estudo, foram descritos 11 casos de LTA de pacientes residentes no Distrito Federal e que permaneceram na região num período de seis meses a dois anos, antes do início da doença.

Os achados clínicos encontrados estão de acordo com outros estudos (LESSA et al., 2007; AMATO et al., 2007).

A mucosa nasal é o local mais afetado pelas lesões da LTA na forma mucosa. Em todos os casos do estudo foi descrita alteração nessa topografia. Em seguida, estão a orofaringe (palato mole e duro), lábios e laringe. Em três casos (caso 01, 11 e 16), estava descrito lesão de pele ulcerada que não tinham relato de biópsia cutânea. Pela suspeita clínica desses casos para LTA e confirmação da doença na biópsia da lesão mucosa, estes casos foram alocados como exemplos da forma clínica concomitante da LTA mucosa.

Entre as comorbidades encontradas, tiveram outras doenças infecciosas e parasitárias: Malária, Doença de Chagas, Hepatite-B e AIDS, sendo que as duas primeiras são comumente encontradas em pacientes com LTA por apresentarem, de certa forma, o mesmo ambiente de contágio dos agentes etiológicos (LESSA et al., 2007; AMATO et al., 2007).

Os sintomas citados foram variados. Foram relatados desde sintomas locais, como a obstrução nasal (em 25% dos casos), até sistêmicos como febre e inapetência. A obstrução nasal, coriza e epistaxe são os sintomas mais precoces que ocorrem quando há edema e hiperemia do septo nasal. Com agravo do quadro, a pele do nariz se torna espessada e edemaciada, configurando o conhecido "nariz de tapir". A perfuração do septo nasal é um evento subsequente, sendo sinal de agressão tecidual que pode se estender para todo nariz, lábios e palato (LESSA et al., 2007).

Ao exame ORL, predominou lesão infiltrada com algum grau de perda da integridade do epitélio (alteração inflamatória), sendo a ulceração com perfuração do septo nasal a mais comumente encontrada (61,11%). A descrição da maioria das lesões encontradas nos prontuários foi sucinta.

Na revisão dos casos, a forma clínica da LTA não era estabelecida pelo médico assistente de forma objetiva. Foram classificadas no decorrer do estudo de acordo com os achados clínicos e laboratoriais dos prontuários. Houve predomínio da forma indeterminada (44,44%), ou seja, casos em que não se definiu a porta de entrada do parasita, supondo que estes não tiveram uma manifestação cutânea prévia (MINISTÉRIO, 2006).

Na LTA mucosa, a não ocorrência de forma primária sugere que as lesões sejam mesmo evoluções da forma cutânea. Além disso, a existência de formas concomitantes (lesões cutâneas e mucosas ativas), já previamente descritas por vários autores, comprova a necessidade do exame ORL de todos os casos recém diagnosticados de LTA cutânea (BOAVENTURA et al., 2006).

A IRM foi realizada em 88,89% dos casos do estudo e todos eles houve formação de nodulação que variou de 7 a 38mm de diâmetro, ou seja, positivos. Isso está de acordo com a literatura, em que é descrita positividade acima de 95% em casos da forma mucosa. O resultado negativo é reservado aqueles com alguma forma de imunodepressão. Essa observação indica a IRM como um importante exame no apoio diagnóstico da LTA mucosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A IFA além de ser utilizada no diagnóstico da LTA, também tem aplicação no acompanhamento do tratamento e no seguimento após a cura da doença. Dos casos do estudo, em 88,89% foi encontrado a primeira IFA para o diagnóstico da LTA, sendo que em 25% desses casos o resultado foi não reagente e nos demais (reagentes) a titulação variou de 1/20 a 1/320 (43,75% delas com titulação de 1/80).

Em relação aos métodos parasitológicos (inoculação em *hamster*, esfregaço e cultura), não foi possível estabelecer um parâmetro de comparabilidade entre eles, já que nem todos eles foram realizados em todos os casos e quando existia um deles faltava um ou os outros dois.

O tratamento de escolha, preconizado por AMATO et al., (2008) e pelo MINISTÉRIO DA SAÚDE (2006), da forma mucosa da LTA é o antimonial

pentavalente (Glucantime®) na dose de 20mg/kg/dia por 30 dias e no máximo de 1275mg (3 ampolas). A droga de escolha de todos os casos foi o antimonial pentavalente, porém o registro do período de tratamento e o critério de cura dos casos do estudo não foram constantes. Exceto em casos de pacientes internados, em que foram descritos os 30 dias preconizados no tratamento, nem sempre foi encontrado referência ao número de doses utilizadas. Também não foi possível avaliar se houve resolução da lesão porque nem sempre era realizado um exame ORL de controle após o tratamento. Isso não permitiu que se fizesse uma correlação entre a resposta ao tratamento e a classe histopatológica.

Quanto a localização, a maioria das biópsias foram retiradas da mucosa nasal (55,56%) e no palato mole (33,33%). Além de serem as regiões mais afetadas pelas lesões da LTA, elas são as mais acessíveis para a obtenção fragmentos durante o exame ORL (LESSA et al., 2007).

As alterações histopatológicas epiteliais hiperplásicas e inflamatórias ocorreram em todos os casos, sendo que a primeira não foi aplicável ao caso 1, pelo fato que o fragmento foi retirado de uma área totalmente ulcerada. As alterações epiteliais formam combinadas já que sempre que há certo grau de hiperplasia, também existe nível de esponjose intra-epitelial para posterior perda da integridade da superfície (erosão/ulceração).

Todos os critérios das alterações histopatológicas referente ao infiltrado celular no córion foram presentes em algum dos casos, exceto os macrófagos vacuolizados. Esses macrófagos são células numerosas encontradas principalmente em lesões causadas pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e albergam grande quantidade de formas amastigotas no citoplasma. Sabendo da região em que se encontram os casos estudados e por se tratar da forma mucosa da LTA, explica-se a ausência dessas células (índice=0) em todos os casos do estudo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O granuloma, apesar de ser um achado histopatológico facilmente identificado no corte histológico, esteve presente em apenas cinco casos do estudo.

Das alterações tissulares adaptativas/inflamatórias, a reação conjuntiva foi encontrada em variadas proporções, principalmente na circunjacência do infiltrado inflamatório visando à cicatrização tecidual. Enquanto que a necrose aguda/subaguda foi escassa, mas o seu reconhecimento é de grande importância porque a sua presença ou ausência implica na alteração da classe histopatológica (REC/REN ou RENG/REG).

A presença do parasita na histopatologia é uma forma rápida e de baixo custo para o diagnóstico da LTA, melhorando a assistência ao paciente e início precoce do tratamento. Neste estudo, a demonstração da *Leishmania* pela histopatologia foi possível em 33,33% dos casos e de forma escassa (índice variando de 0 a 2), estando de acordo com outros estudos (ZAJTCHUCK et al., 1989). A utilização de métodos parasitológicos (cultura, inoculação em *hamster* e esfregaço) demonstrou ser uma forma de aumentar a demonstração do parasita, como visto pelo estudo. A demonstração do agente etiológico nos casos foi de 33,33% somente no método histopatológico para 44,44% quando foi aplicado algum método parasitológico, principalmente o esfregaço (MINISTÉRIO, 2006). Houve maior demonstração da *Leishmania* em casos que tiveram contato prévio com o antimonial pentavalente no tratamento da forma cutânea da LTA do que em casos de pacientes que nunca receberam esse tipo de tratamento. Desse fato, poderia investigar a possível seleção de cepas de *Leishmania* resistentes que poderiam ter maior evasão ao processo inflamatório e permanecerem mais tempo na lesão,

sendo mais encontradas quando fossem tomados os fragmentos das mesmas.

O número pequeno de casos foi um importante empecilho para a estatística do estudo, dificultando conseguir outras formas clínicas de LTA mucosa que representassem outra maior quantidade das classes histopatológicas. Também pela própria distribuição da frequência das classes histopatológicas que tem proporções muito distintas, como observados mesmo em estudos com grandes amostras, a análise estatística, sobretudo dos marcadores imuno-histoquímicos, teria um resultado prejudicado. Como no estudo realizado por MAGALHÃES (1997), em que se tem relatado os achados histopatológicos do maior número de casos da forma mucosa da LTA (74 casos), foram encontradas as seguintes proporções das classes histopatológicas: REC – 63,30%, REG – 13,50%, RENG – 10,80% e REN – 9,40%. Dados semelhantes foram encontrados neste estudo, em que a classe REC foi a mais freqüente (66,67% dos casos) e não foram encontrados exemplos das classes RES (reação exsudativa sarcoidiforme) e RET (reação exsudativa tuberculóide).

Neste estudo, percebe-se que uma forma clínica pode ter expressão em classes histopatológicas diferentes, pois constituem estágios evolutivos do processo inflamatório. Assim, uma classe histopatológica não define a forma clínica da LTA como em doenças como a Hanseníase, na qual o patologista contribui com o clínico na definição da forma da doença. No geral, a classe REC predominou no estudo, mas também em relação a todas as formas clínicas (tardia, indeterminada e concomitante). As classes REN e RENG parecem intermediárias às classes REC e REG, sendo a necrose tecidual transitória. Essa ocorre na classe REC, tornando-a REN, suscitando a formação do granuloma e constituindo a classe RENG. Na seqüência, há resolução da necrose e restando a classe REG. Dessa, ocorre dissolução do granuloma que dá lugar à cicatrização tecidual ou manutenção da resposta exsudativa celular (MAGALHÃES, 1997).

O programa UnBVision (HORITA, 2001) foi o utilizado pela primeira vez em um estudo para avaliação do número de células positivas por campo em imagens capturadas de cortes histológicos de tecidos. Ele obteve excelente praticidade e aplicabilidade na contagem das células positivas pelos marcadores imuno-histoquímicos, facilitando sobremaneira este estudo.

Analisando a quantidade total de células positivas, quando comparadas as classes entre si, elas se mostraram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), exceto quando se comparou a classe REG/REN em que não teve significância estatística ($p = 0,499$). Isso mostra que, apesar das classes serem estágios evolutivos de um processo inflamatório, elas são também, além de qualitativamente, quantitativamente distintas.

No estudo imuno-histoquímico, a maior proporção de linfócitos T em todos os casos em relação aos linfócitos B comprova que a resposta imune predominante na LTA é mais celular do que humoral. Embora esta também exista já que foi encontrada alguma quantidade de plasmócitos em 94,44% casos (MURRAY et al., 2005).

De acordo com outros estudos, estima-se que na forma mucosa da LTA há predomínio de linfócitos T CD4⁺ em relação aos linfócitos T CD8⁺ (BARRAL et al., 1987; COUTINHO et al., 2002; AMATO et al., 2003; SILVEIRA et al., 2004; MORGADO et al., 2007; TUON et al., 2008).

Futuramente, a utilização da imuno-histoquímica para identificar as citocinas INF- γ , TNF- α , IL12, IL-4 e IL-10, para complementar este estudo poderia remeter a qual resposta por linfócitos T CD4⁺ predomina: Th1 ou Th2, correlacionando com achados histopatológicos como a presença de granulomas e do parasita.

Somente no caso 6, único exemplo de classe histopatológica REG, houve um predomínio de linfócitos T CD8⁺ em relação aos linfócitos T CD4⁺. Buscando nos dados clínicos/ laboratoriais desse paciente, percebe-se que ele tinha a IFA de maior titulação do estudo (1/320) e IRM forte reator (27x27mm), além de uma lesão da mucosa nasal/ palato somente infiltrada. Provavelmente, trata-se de uma lesão que teve um aumento transitório de linfócitos T CD8⁺ para a destruição citotóxica de macrófagos parasitados, como descritos em alguns estudos, com evolução pra uma cura (RUIZ & BECKER, 2007; TUON et al., 2008).

A positividade de células inflamatórias para o Bcl-2 foi semelhante entre as classes histopatológicas, sendo maior no único exemplo da classe REG. Indicando que há um prolongamento do tempo de vida de células inflamatórias, em sua maioria linfócitos, nas lesões. Isso nos linfócitos seria positivo para a manutenção do processo inflamatório celular. Entretanto, a existência, mesmo em menor proporção, da inibição da apoptose em macrófagos permitiria a permanência da principal célula que alberga o parasita, sendo uma forma de persistência deste no tecido (MATLASHEWSKI, 1994). Melhores conclusões em relação a apoptose, neste estudo, seriam possíveis se também tivesse sido realizados marcadores pró-apoptóticos e outros antiapoptóticos.

As diferenças importantes que ocorreram no número de células positivas/mm² em relação a algum marcador foram em classes unitárias (REG e REN), o que dificultou a comparabilidade entre elas por não existir outra amostra para observar a manutenção do padrão de resposta inflamatória.

Como algumas classes histopatológicas não se repetiram no estudo para que elas pudessem ser comparadas e explicar as diferenças entre a população celular encontrada no perfil imuno-histoquímico, foram analisados outros critérios. Para isso foram confrontados grupos com contato prévio com o antimonial pentavalente, no tratamento da forma cutânea da LTA, aqueles com presença de granulomas ou de *Leishmania* no método histopatológico. Todos esses critérios não tiveram significância estatística ($p > 0,05$) para explicar a diferença de número de células positivas para todos os marcadores aplicados no estudo.

CONCLUSÃO

1. A maioria dos pacientes do HuB no estudo é do sexo masculino, ligado à atividade rural, naturais e procedentes da região Centro-Oeste, com média de idade de 50 anos, com queixa de obstrução nasal e lesão de mucosa nasal infiltrada com ulceração e perfuração de septo, ao exame ORL. Laboratorialmente, todos pacientes que realizaram IRM tiveram resultados positivos, predomínio de IFA reagente (titulação de 1/80), baixa identificação de parasitas por métodos parasitológicos e histopatológicos (44,44%) e tendo o Glucantime® como a droga de escolha para tratamento.

2. As biópsias foram obtidas mais freqüentemente da mucosa nasal e palato mole, com alterações importantes do epitélio com hiperplasia e erosão/ulceração.

3. Nas alterações inflamatórias celulares, há predomínio de um infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário denso ocasionalmente com granulomas mal formados, alguns com células de Langhans, e ausência de macrófagos vacuolizados.

4. Em relação às alterações tissulares inflamatórias/ adaptativas, a reação conjuntiva está mais presente na periferia do infiltrado inflamatório evoluindo para a cicatrização das lesões; a necrose aguda/subaguda é pouco freqüente e discreta, mas importante na classificação das lesões.

5. Os parasitas foram encontrados de forma escassa e em poucos casos na histopatologia (33,33% dos casos – principalmente naqueles que tiveram contato prévio com Glucantime®).

6. A classe REC foi a mais freqüente (66,67%) e não foram encontradas as formas RES e RET.

7. Pela primeira vez foi utilizado o UnBVision (HORITA, 2001) em um estudo e atestada a sua aplicabilidade e praticidade na quantificação de células em imagens digitais capturadas em microscopia óptica, ainda mais em reações imuno-histoquímicas.

8. Quando as classes histopatológicas foram comparadas entre si, em relação à quantidade de células positivas no perfil imuno-histoquímico, houve significância estatística ($p < 0,05$) entre elas, exceto entre as classe REG e REN ($p > 0,05$), mostrando que a maioria delas também são, além de qualitativamente, quantitativamente diferentes.

9. Em todos os casos houve predomínio de células T (CD45ro positivas) em relação aos linfócitos B (CD20 positivas) atestando que a resposta imune da LTA mucosa é mais celular que humoral.

10. De acordo com outros estudos, estima-se que na forma mucosa da LTA há predomínio de linfócitos T CD4⁺ em relação aos linfócitos T CD8⁺, exceto no único exemplo de caso REG.

11. A utilização de um perfil imuno-histoquímico, em estudos futuros, para estudar as citocinas presentes nas lesões pode contribuir na elucidação do paradigma entre a resposta imune Th1 e Th2.

12. A presença de considerável positividade celular para o Bcl-2, no infiltrado inflamatório das lesões, mostra que a apoptose pode ser detalhadamente explorada utilizando marcadores pró-apoptóticos e outros anti-apoptóticos.

13. Confrontados grupos com contato prévio com o antimonial pentavalente, no tratamento da forma cutânea da LTA, aqueles com presença de granulomas ou de *Leishmania* no método histopatológico não obtiveram significância estatística ($p > 0,05$) para explicar a diferença da freqüência de células estudadas na imuno-histoquímica.