

**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA**

**CURSO DE MEDICINA**

**ALMÉRIO LIBÓRIO LOPES DE NORONHA FILHO**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA *IN SITU* EM INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA COM INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO NEGATIVA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

###### SALVADOR

**2023**

**ALMÉRIO LIBÓRIO LOPES DE NORONHA FILHO**

###### AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA *IN SITU* EM INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA COM INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO NEGATIVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para aprovação parcial no 4º ano do curso de Medicina.

Orientador(a): Dr. Sérgio Marcos Arruda

###### SALVADOR

**2023**

###### AGRADECIMENTOS

A produção deste trabalho de conclusão de curso foi possibilitada devido à ajuda de diversas pessoas, dentre as quais agradeço:

A meu professor orientador, Dr. Sérgio Arruda, por todo o auxílio, persistência e determinação para que levássemos o projeto adiante. Seus ensinamentos foram muito enriquecedores e agregaram enormemente à minha formação.

A Dr. Edgar Carvalho, pelas discussões científicas e incentivo ao estudo.

A Dr. Lucas Carvalho, pela possibilidade de poder realizar este estudo, bem como pelo grande suporte prestado durante os últimos dois anos.

A Débora por todo o ensino, companheirismo e contribuições valiosas; por ter me guiado na seleção correta de pacientes, na realização das imuno-histoquímicas, bem como em sua quantificação.

A toda a equipe do LAPEC (Laboratório de Pesquisas Clínicas), bem como do Serviço de Histotecnologia da FIOCRUZ – BA, responsável pelo corte dos fragmentos de biópsia e pela coloração das lâminas utilizadas no estudo.

A meu pai, Almério, e a minha mãe, Pattrícia, pelo suporte incondicional em toda minha trajetória acadêmica e por todos os ensinamentos valiosos desde meu nascimento.

A meus irmãos, Maria Alícia, Úrsula e Miguel, os quais amo e com quem sei que posso contar sempre, por estarem presentes.

A meus tios, avós e demais membros da minha família, que foram fundamentais para minha educação e sempre me apoiaram.

A todos os professores que participaram de minha formação desde o ensino infantil, por terem contribuído para que eu pudesse crescer intelectualmente e me conscientizar.

A meus amigos, com quem posso dividir as frustrações e alegrias, por tornarem a graduação muito mais leve e aprazível.

A todos que me ajudaram dalguma forma, mas não foram mencionados.

“*Por que você está procurando harmonia? Há harmonia em todas as*

*coisas.*”

Grimes

###### RESUMO

**Introdução**: O termo “leishmaniose” refere-se a um conjunto de doenças tropicais negligenciadas causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania*. Ele é transmitido ao homem durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea. Na pele humana, o parasito é fagocitado principalmente por macrófagos e induz uma resposta inflamatória crônica no hospedeiro. A forma clínica mais comum da doença, no Brasil, é a leishmaniose cutânea (LC), caracterizada pela presença de uma única lesão ulcerada, indolor e de bordas elevadas. Na Bahia, o distrito de Corte de Pedra, parte do município de Presidente Tancredo Neves, é uma região endêmica de *Leishmania braziliensis*,uma das espéciesmais comuns do parasito no país. A intradermorreação de Montenegro (IDRM) é um teste de hipersensibilidade tardia que avalia a responsividade dum indivíduo ao antígeno da leishmânia, o que pode indicar tanto doença em curso quanto história prévia de leishmaniose. **Objetivos**: Comparar os aspectos histopatológicos entre biópsias de pacientes com LC e IDRM negativa e pacientes com LC e IDRM positiva. **Metodologia**: Foram selecionadas 42 biópsias de pele de pacientes com LC confirmada pela reação da polimerase em cadeia (PCR) e imuno-histoquímica (IHQ), sendo 26 delas de pacientes com IDRM- e 16 de pacientes com IDRM+. Os fragmentos de pele foram obtidos por biópsia por *Punch* 4mm entre os anos de 2014 e 2021. Todos os pacientes são residentes de Corte de Pedra (BA), não são obesos nem portadores de VIH. **Resultados**: Embora os grupos não apresentem diferenças quanto às extensões de inflamação e necrose tissular, indivíduos com IDRM- apresentaram um número maior de amastigotas e plasmócitos em suas biópsias, bem como uma quantidade inferior de granulomas. Outros marcadores de IHQ, como células CD8+, CD20+, CD57+ e CD68+, foram observados em quantidades semelhantes em ambos os grupos **Conclusão**: A diferença de padrões de resposta inflamatória entre os dois grupos parece influenciar na histopatologia das úlceras leishmanióticas.

**Palavras-chave**: Leishmaniose cutânea. *Leishmania braziliensis*. Intradermorreação de Montenegro.

###### ABSTRACT

**Introduction**: The term "leishmaniasis" refers to a group of neglected tropical diseases caused by a protozoan of the *Leishmania* genus. It is transmitted to humans during female sandflies’ blood feeding. On human skin, the parasite is phagocytized mainly by macrophages and induces a chronic inflammatory response in the host. The most common clinical form of the disease, in Brazil, is cutaneous leishmaniasis (CL), characterized by the presence of a single ulcerated, painless lesion with raised borders. In Bahia, Corte de Pedra, a district of Presidente Tancredo Neves, is an endemic region for *Leishmania braziliensis*, one of the most common species of the parasite in the country. The leishmanin skin test (LST) is a delayed type hypersensitivity test that assesses an individual's responsiveness to the leishmania antigen, which can indicate both ongoing disease and a previous history of leishmaniasis. **Objectives**: To compare the histopathological aspects between biopsies from patients with CL and negative LST and patients with CL and positive LST. **Methodology**: 42 skin biopsies were selected from patients with CL confirmed by polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry (IHC), 26 of them from LST- patients and 16 from LST+ patients. The skin fragments were obtained by 4mm punch biopsy between 2014 and 2021. All the patients were residents of Corte de Pedra (BA) and were neither obese nor HIV-positive. **Results**: Although the groups did not differ in terms of the extent of inflammation and tissular necrosis, LST- individuals had a higher number of amastigotes and plasma cells in their biopsies, as well as a lower number of granulomas. Other IHC markers, such as CD8+, CD20+, CD57+ and CD68+ cells, were observed in similar quantities in both groups **Conclusion**: The difference in inflammatory response patterns between the two groups seems to influence the histopathology of leishmaniasis ulcers.

**Keywords**: Cutaneous leishmaniasis. *Leishmania braziliensis*. Leishmanin skin test.

**SUMÁRIO**

[1 INTRODUÇÃO 8](#_Toc32345)

[2 OBJETIVOS 10](#_Toc32346)

[2.1 GERAL 10](#_Toc32347)

[2.2 ESPECÍFICOS 10](#_Toc32348)

[3 REVISÃO DE LITERATURA 11](#_Toc32349)

[3.1 EPIDEMIOLOGIA 11](#_Toc32350)

[3.2 CICLO DE VIDA E TRANSMISSÃO 11](#_Toc32351)

[3.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E MÉTODOS DIAGNÓSTICOS 12](#_Toc32352)

[3.4 INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO 13](#_Toc32353)

[3.5 HISTOPATOLOGIA 14](#_Toc32354)

[4 METODOLOGIA 15](#_Toc32355)

[4.1 DESENHO DE ESTUDO 15](#_Toc32356)

[4.2 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO 15](#_Toc32357)

[4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO 15](#_Toc32358)

[4.3.1 População-alvo 15](#_Toc32359)

[4.3.2 População acessível 15](#_Toc32360)

[4.3.3 Critérios de elegibilidade 15](#_Toc32361)

[4.3.3.1 Critérios de inclusão 15](#_Toc32362)

[4.3.3.2 Critérios de exclusão 15](#_Toc32363)

[4.3.4 Tamanho e seleção amostral 16](#_Toc32364)

[4.3.5 Fonte de dados 16](#_Toc32365)

[4.3.6 Instrumento da coleta de dados 16](#_Toc32366)

[4.3.7 Procedimento da coleta de dados 16](#_Toc32367)

[4.3.7.1 Análise histopatológica 16](#_Toc32368)

[4.3.7.1.1 Análise subjetiva 16](#_Toc32369)

[4.3.7.1.2 Análise objetiva 17](#_Toc32370)

[4.3.7.2 Imuno-histoquímica 17](#_Toc32371)

[4.4 VARIÁVEIS 17](#_Toc32372)

[4.4.1 Biológicas 17](#_Toc32373)

[4.4.2 Clínicas 17](#_Toc32374)

[4.4.3 Imuno-histoquímicas 17](#_Toc32375)

[4.5 PLANO DE ANÁLISE DE DADOS 18](#_Toc32376)

[4.6 ASPECTOS ÉTICOS 18](#_Toc32377)

[5 RESULTADOS 19](#_Toc32378)

[6 DISCUSSÃO 21](#_Toc32379)

[7 CONCLUSÃO 23](#_Toc32380)

[8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 24](#_Toc32381)

# INTRODUÇÃO

Leishmaniose Cutânea (LC) é a forma clínica mais comum no Brasil de Leishmaniose Tegumentar Americana, doença negligenciada causada por parasitos intracelulares do gênero *Leishmania*. As formas infectantes promastigotas metacíclicas desse parasito são transmitidas ao homem pela picada do flebotomíneo fêmea infectado. Na derme, elas se aderem à superfície de macrófagos e células dendríticas, induzindo uma fagocitose mediada por receptores. No meio intracelular, essas promastigotas convertemse em amastigotas, forma característica do parasitismo em mamíferos, e replicam-se. Macrófagos infectados, ou com amastigotas, produzem várias citocinas, as quais recrutam células que formam a inflamação crônica, que pode ser, por vezes, granulomatosa, na pele. Essa inflamação crônica tem papel controverso: se, por um lado, ela controla a replicação das amastigotas, por outro, contribui para destruição tecidual e formação da úlcera1, 2.

 As intradermorreações são testes que avaliam a hipersensibilidade tardia de pacientes a antígenos específicos para algumas doenças infecciosas, como tuberculose, hanseníase, esquistossomose e leishmaniose. Sabe-se que as intradermorreações de Montenegro (IDRM) verificam a presença de células T imune específicas aos antígenos de leishmânias2. Essas células produzem IFN-γ, na derme, e induzem uma inflamação local, que pode ser mensurada: induração ≥ a 5mm é considerada positiva. Em Corte de Pedra, distrito localizado no município de Presidente Tancredo Neves (BA), região endêmica de transmissão de *L. braziliensis*, cerca de 10-15% dos moradores têm IDRM+ assintomáticos3, e, dos pacientes com úlceras de LC, cerca de 97% têm teste positivo, e apenas 3% têm IDRM-2.

Um artigo já publicado2 revelou que pacientes com LC e IDRM- têm uma diminuição de resposta Th1 e maior falha terapêutica ao antimoniato de N-metil glucamine (SbV) quando comparados aos pacientes que possuem hipersensibilidade tardia ao antígeno das leishmânias. No entanto, os aspectos histopatológicos objetivos e subjetivos das biópsias não foram detalhadamente descritos. É importante caracterizá-los, a fim de que se verifiquem possíveis associações entre a apresentação dos tecidos e a resposta inflamatória dos pacientes com LC e IDRM-.

O estabelecimento ou não de diferenças no padrão histológico de lesões em cada grupo pode auxiliar no entendimento da patogênese e do curso da doença. Dessa forma, uma análise tecidual com maior grau de detalhamento pode ser útil a pacientes que não possuam reatividade à IDRM, por ajudar a elucidar o comportamento da *L. braziliensis* nesses indivíduos.

# OBJETIVOS

## GERAL

Comparar os aspectos histopatológicos entre biópsias de pacientes com Leishmaniose Cutânea (LC) e intradermorreação de Montenegro (IDRM) negativa e pacientes com LC e IDRM positiva.

## ESPECÍFICOS

* Comparar a extensão das áreas de inflamação de biópsias de pele entre pacientes com IDRM positiva e IDRM negativa;
* Comparar a extensão das áreas de necrose de biópsias de pele entre pacientes de ambos os grupos;
* Avaliar a presença de granulomas em biópsias de pele de pacientes de ambos os grupos;
* Identificar e quantificar plasmócitos, por análise de lâminas coradas em PAS, em biópsias de pele de pacientes ambos os grupos;
* Imunomarcar e quantificar amastigotas de *L. braziliensis* por imuno-histoquímica (IHQ) a partir das biópsias de pele de pacientes de ambos os grupos;
* Identificar e quantificar, por IHQ, linfócitos B CD20+ em ambos os grupos, estabelecendo comparações e correlações;
* Identificar e quantificar, por IHQ, macrófagos CD68+ em ambos os grupos, estabelecendo comparações e correlações;
* Identificar e quantificar, por IHQ, células NK CD56+ em ambos os grupos, estabelecendo comparações e correlações;
* Identificar e quantificar, por IHQ, linfócitos T CD8+ em ambos os grupos, estabelecendo comparações e correlações;
* Identificar e quantificar, por IHQ, IL-1β+ e granzima B+ em ambos os grupos, estabelecendo comparações e correlações.

# REVISÃO DE LITERATURA

## EPIDEMIOLOGIA

Leishmaniose é o nome dado a uma série de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. A expressão “Leishmaniose Tegumentar Americana” (LTA) é utilizada para descrever a forma clínica da doença que acomete pele (leishmaniose cutânea; LC) e/ou mucosas (leishmaniose mucosa; LM). Ainda que haja registros de leishmaniose tegumentar na América do Norte ou na Europa, a maioria dos casos é verificada em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento: cerca de 75% de todos os casos de LC são registrados no Afeganistão, Brasil e Síria4.

No Brasil, a forma clínica mais comum da doença é a LC. Cerca de 18 mil casos são notificados por ano no país5, podendo estar associados a diferentes espécies do parasito. *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lansoni*, *L. lindembergi*, *L. naiffi* e *L. shawi* são as espécies presentes no Brasil6. Diferentes formas clínicas da doença podem ser desenvolvidas em infecções por diferentes espécies de leishmânia7. Ainda que haja casos autóctones em todas as unidades federativas, as notificações concentram-se principalmente nas regiões Norte e Nordeste, responsáveis por cerca de 2/3 delas, sendo seguidas por Centro-Oeste, Sudeste e Sul5. Estados que contêm regiões endêmicas incluem Amazônia, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo8.

## CICLO DE VIDA E TRANSMISSÃO

Os parasitos do gênero *Leishmania* são classificados como dimórficos, visto que possuem duas formas morfológicas principais, que estão relacionadas a diferentes fases de seu ciclo de vida: amastigota e promastigota14, 15.

O parasito causador da LC é transmitido ao homem por meio da picada do flebotomíneo fêmea, vulgarmente conhecido como “mosquito-palha”, inseto de hábito crepuscular. As formas promastigotas metacíclicas das leishmânias ficam localizadas na probóscide do vetor e são transferidas ao sangue do mamífero durante o repasto sanguíneo. No hospedeiro vertebrado, elas ativam uma resposta inflamatória e, ao serem fagocitadas, modificam-se estruturalmente, dando origem às formas amastigotas dos parasitos16, que se multiplicam por divisão binária e causam morte celular. No sangue dos mamíferos, as amastigotas estão livres para infectar novas células fagocitárias15.

Outros flebotomíneos fêmeas podem, ao se alimentar do sangue do hospedeiro infectado, ingerir fagócitos com amastigotas em seu interior, que, ao se multiplicarem e romperem a membrana celular dos leucócitos, ficam expostos no interior do intestino do flebotomíneo. Lá, tais amastigotas sofrem um processo de mudança estrutural, que pode levar de quatro a 25 dias15. Primeiramente, são geradas as formas promastigotas procíclicas, ainda no trato intestinal. Depois, elas avançam à probóscide do vetor, onde sofrem outro processo de maturação, transformando-se em promastigotas metacíclicos e, assim, reiniciando o ciclo de transmissão16.

Hos

p

edeiro

/Reservatório

Flebotomíneo infectado

Flebotomíneo

não infectado

Úlcera leishmaniótica

Figura 1: **Ciclo de transmissão da LC**. Os flebótomos fêmeas infectados transmitem a doença para hospedeiros mamíferos saudáveis, que passam a estar infectados e, consequentemente, a contaminar outros flebotomíneos. Vertebrados infectados desenvolvem uma lesão ulcerada no local da picada.

## MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

A LC manifesta-se geralmente como uma lesão ulcerada, com bordas bemdelimitadas e elevadas, indolor e única. No entanto, considera-se que são portadores de LC pacientes com até 20 lesões ulceradas, visto que uma pessoa pode ter sido picada mais de uma vez por um vetor infectado10. No entanto, manifestações clínicas com 21 lesões papuliformes ou mais são sugestivas de leishmaniose disseminada (LD), forma clínica mais grave do que a LC.

De início, forma-se, no local da picada do vetor, uma pápula que evolui ao longo de semanas a meses para um nódulo, que ulcera lentamente durante alguns meses10. Em alguns casos, o nódulo não ulcera, podendo evoluir com hiperqueratose11. Pode haver prurido em qualquer estágio, porém as lesões são indolores. A reepitelização das lesões faz parte da história natural da LC e ocorre entre 3 e 18 meses, porém sua velocidade varia de acordo com a espécie de parasito11, 18.

O diagnóstico da LC é feito associando-se os achados clínicos compatíveis com a doença aos métodos de diagnóstico laboratorial. O exame mais comumente utilizado para a confirmação de LC é o parasitológico direto12, em que se observam amastigotas à microscopia óptica em biópsias de úlceras. Outros métodos incluem sorologia, cultura parasitária e reação da polimerase em cadeia (PCR)13, um método altamente sensível e geralmente empregado quando não se consegue visualizar as amastigotas à histopatologia.

## INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO

Em 1926, João Montenegro descreveu a prova de intradermorreação para diagnóstico de úlceras leishmanióticas9. O teste, também conhecido como hipersensibilidade tardia (DTH), consiste na avaliação dérmica do paciente entre 48 e 72h após a injeção de antígenos de parasitos do gênero *Leishmania*. Pacientes que possuem LC ou história prévia de LC geralmente têm um teste positivo, ou seja, desenvolvem uma induração igual ou superior a 5mm de diâmetro no local em que o antígeno foi aplicado, a qual está associada à ação linfocitária e à produção de IFN-γ2. No entanto, uma pequena parcela de indivíduos desse grupo apresenta teste negativo2, o que se espera de pessoas que nunca tiveram LC.

A IDRM possui altas sensibilidade e especificidade15, 16, 17, porém, como não diferencia o contato prévio com o parasito da infecção ativa, é raramente utilizada como método diagnóstico nos dias atuais, sendo mais empregada em estudos epidemiológicos e como teste diagnóstico complementar17.

## HISTOPATOLOGIA

A histopatologia da LC revela, como principal caraterística, uma inflamação tecidual crônica, provocada pelo parasito, que se encontra no interior de células fagocitárias. Uma biópsia de úlcera leishmaniótica pode conter regiões de necrose tissular e granulomas, enquanto seu infiltrado inflamatório inclui macrófagos, linfócitos, neutrófilos e plasmócitos17. A quantidade de amastigotas visualizadas tende a diminuir com o passar do tempo, assim como o número de plasmócitos se eleva18.

O estado da arte é pobre em estudos que correlacionem a histopatologia da LC à reação intradérmica, porém um artigo recente2 sugere que aqueles com IDRM- têm menos área de inflamação, focos de necrose tissular e mais linfócitos CD8+, além duma tendência maior a falha terapêutica.



Figura 2: Seção histológica de biópsia de pele dum paciente com LC; aumento de 40x.

# METODOLOGIA

## DESENHO DE ESTUDO

 Este é um estudo de corte transversal com grupo controle.

## LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

 As biópsias analisadas foram coletadas no Centro de Referência em Leishmaniose Dr. Jackson Maurício Lopes Costa, no distrito Corte de Pedra, município baiano de Presidente Tancredo Neves. Elas foram coletadas entre os anos de 2014 e 2021.

## POPULAÇÃO DO ESTUDO

### População-alvo

 Pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*.

### População acessível

 Pacientes com LC atendidos no centro de referência em leishmaniose localizado no distrito de Corte de Pedra, em Presidente Tancredo Neves, BA.

### Critérios de elegibilidade

#### Critérios de inclusão

 Pacientes com lesões cutâneas compatíveis com LC, PCR+ para *L. braziliensis* e presença de amastigotas confirmada por IHQ.

#### Critérios de exclusão

 Pacientes com leishmaniose cutânea disseminada, história prévia de leishmaniose, VIH positivo ou obesidade.

### Tamanho e seleção amostral

 Este estudo utiliza amostra de conveniência. Foram selecionadas 42 biópsias de pele para a análise comparativa, sendo 26 delas de pacientes com IDRM- e 16 de pacientes com IDRM+ para controle. Os 26 casos selecionados representam a totalidade de biópsias de pacientes com IDRM- disponíveis para a avaliação no universo de biópsias coletadas, enquanto os 16 pacientes com IDRM+ foram escolhidos de forma aleatória.

### Fonte de dados

 A fonte de dados deste estudo é primária: fragmentos de biópsia coletados das bordas de úlceras dos pacientes incluídos.

### Instrumento da coleta de dados

 Os fragmentos de biópsia foram coletados por meio de biópsia por *punch* 4mm.

### Procedimento da coleta de dados

 Após coletados, os fragmentos de biópsia foram fixados em paraformaldeído 4%, emblocados em parafina, recortados com 5µm de espessura e, então, corados em H&E e PAS ou separados para IHQ.

#### Análise histopatológica

 A análise das lâminas foi feita sem identificação dos grupos incluídos no estudo e realizada em duas etapas:

##### Análise subjetiva

 Realizada por dois observadores em microscópio de multi observação, em que foram avaliadas a extensão de inflamação (regiões com infiltrado inflamatório, principalmente às custas de macrófagos, linfócitos e plasmócitos), fibrose, necrose (regiões com destruição tecidual), presença ou não de granulomas, células-gigantes, as quantidades de plasmócitos, neutrófilos e amastigotas, quantificando-se de + a +++;

##### Análise objetiva

 A quantificação das áreas total da derme, da inflamação e da necrose se deu pela mensuração de imagens capturadas por câmera Moticam 1080 acoplada ao microscópio Nikon Eclipse Ci.

 Os cálculos foram feitos pelo programa da câmera, previamente calibrada. A contagem de plasmócitos foi feita no mesmo microscópio em biópsias coradas por PAS em ampliação de 200X. As porcentagens de inflamação foram calculadas em relação à área dérmica total da seção histológica, enquanto as porcentagens de necrose foram calculadas em relação à área inflamada da biópsia.

#### Imuno-histoquímica

 A técnica de IHQ foi aplicada utilizando-se anticorpos específicos para identificar e quantificar os seguintes marcadores: CD8+ (Abcam Ref.: ab4055; 1:400), CD20+ (Dako clone L26 Ref.: M0755; 1:100), CD57+ (Abcam Ref.: ab187274 HNK-1/LEU7; 1:200), CD68+ (Dako clone KP1 Ref.: M0814; 1:200), granzima B+ (Cell Marque Ref.: 262A-16; 1:100), IL-1β+ (Cell signaling 3A6 Ref.: 04/2016; 1:40) e amastigotas de *L. braziliensis* (não comercial).

A quantificação das IHQ foi realizada através da contagem de células positivas para cada marcador ao microscópio óptico Laica DMi8 em aumento de 40x, selecionando-se 5 campos aleatórios de cada corte.

## VARIÁVEIS

### Biológicas

 Idade, sexo (masculino/feminino).

### Clínicas

 IDRM (positiva/negativa), presença de granulomas.

### Imuno-histoquímicas

 Números de amastigotas, linfócitos T CD8+, linfócitos B+, CD20+, macrófagos CD68+, células NK CD57+, células marcadas com IL-1β+ e granzima B+.

## PLANO DE ANÁLISE DE DADOS

 Os dados coletados foram organizados numa planilha de *Excel* (*Microsoft Office 2019*), sendo posteriormente utilizados para a geração de gráficos no programa *GraphPad Prism* (V. 8.0.1.244.24), que também foi utilizado para os cálculos de média, mediana e desvio padrão. O teste t de Student foi utilizado para verificar diferenças estatisticamente significantes entre variáveis de distribuição normal. Para variáveis de distribuição não normal, utilizou-se o teste Mann–Whitney, sendo considerados significativos valores de P ≤ 0,05.

## ASPECTOS ÉTICOS

 O projeto foi aprovado pela Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CAAE:

81315517.1.0000.5577).

# RESULTADOS

Comparações de parâmetros clínicos (Tabela 1) revelaram que ambos os grupos, IDRM+ e IDRM-, são semelhantes em idade (p = 0,564) e distribuição de acordo com o sexo (p = 0,516).

Quanto a aspectos histopatológicos (Tabela 2), a porcentagem de área inflamada na biópsia foi ligeiramente maior no IDRM-, mas não mostrou diferença significativa entre ambos os grupos (p = 0,266). Essa inflamação apresentou macrófagos, linfócitos, raros neutrófilos e esteve intercalada por áreas de necrose, às vezes com a formação de granulomas. Não houve diferença significativa entre os grupos em termos de necrose (p = 0,361). Curiosamente, os granulomas foram observados significativamente mais em pacientes com IDRM+ (p = 0,005): 60% dessas biópsias apresentaram granulomas, em contraste aos apenas 15% das biópsias IDRM- que apresentaram granulomas.

Plasmócitos estiveram significativamente mais presentes nos pacientes IDRM- (p = 0,001). Interessantemente, além disso, houve uma relação inversa entre a presença de granulomas e o número de plasmócitos em todas as biópsias analisadas (p = 0,038).

O número de amastigotas detectadas pelo IHQ (Tabela 3) presentes foi significativamente maior nas biópsias IDRM- (p = 0,032). A análise comparativa do perfil celular inflamatório dos grupos IDRM+ e IDRM- revelou que as células mais frequentes, em ambos os grupos, são os macrófagos CD68+, mas as quantidades dessas células não diferem entre as biópsias IDRM+ e IDRM- (p = 0,951).

 Os linfócitos T CD8+ são mais frequentes em indivíduos IDRM-, bem como as marcações para granzima B+ e linfócitos B CD20+, porém a diferença das quantidades desses marcadores em ambos os grupos não foi significativa (respectivamente, p = 0,397, p = 0,272 e p = 0,537). A expressão de IL-1β+ também foi maior e não significativamente diferente no grupo IDRM- (p = 0,668). Por sua vez, o marcador CD57+ foi o único mais presente no grupo IDRM+, porém também sem significância estatística (p = 0,147).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Tabela 1: Características demográficas dos pacient intradermorreação de Montenegro (IDRM)+ ou IDRM-**  | **es com leishmani** | **ose cutânea e**  |
| **Variáveis**  |  | **IDRM+** **(N = 16)**  | **IDRM-** **(N = 26)**  | **Valor de p**  |

Idade em anos (média ± DP) 32,47 ± 14,35 29,64 ± 15,19 0,564

N.º de homens (%) 10 (62,5) 14 (53,8) 0,516

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|   |  |  |  |  |  |
| **Tabela 2: Características histopatológicas dos pacien intradermorreação de Montenegro (IDRM)+ ou IDRM-**  | **tes**  | **com leishmanios** | **e cutânea e**  |
| **Variáveis**  |  |  | **IDRM+** **(N = 16)**  | **IDRM-** **(N = 26)**  | **Valor de p**  |
| Porcentagem de inflamação (média ± DP)  |   | 55,92 ± 20,99  | 63,94 ± 23,74  | 0,266  |
| Porcentagem de necrose (média ± DP)  |   | 27,33 ± 24,54  | 36,50 ± 17,78  | 0,361  |
| N.º de biópsias com granulomas (%)  |   | 9 (56,25)  | 4 (15,38)  | 0,005  |
| N.º de plasmócitos (média ± DP)  |   | 33,14 ± 13,62  | 56,00 ± 14,57  | 0,001  |

|  |
| --- |
| **Tabela 3: Aspectos imuno-histoquímicos dos pacientes com leishmaniose cutânea e intradermorreação de Montenegro (IDRM)+ ou IDRM-**  |
| **Marcadores imuno-histoquímicos**  |  | **IDRM+** **(N = 16)**  | **IDRM-** **(N = 26)**  | **Valor de p**  |
| N.º de amastigotas (média ± DP) |  | 79,86 ± 55,64 | 165,6 ± 91,29 | 0,032 |
| N.º de células CD8+ (média ± DP)  |   | 149,0 ± 196,0  | 227,6 ± 346,2  | 0,397  |
| N.º de células CD20+ (média ± DP)  |   | 74,82 ± 110,4  | 112,5 ± 229,9  | 0,537  |
| N.º de células CD57+ (média ± DP)  |   | 29,17 ± 42,14  | 14,30 ± 20,81  | 0,147  |
| N.º de células CD68+ (média ± DP)  |   | 376,9 ± 311,5  | 370,1 ± 386,1  | 0,951  |
| N.º de células IL-1β+ (média ± DP)  |   | 150,4 ± 294,0  | 203,6 ± 391,3  | 0,668  |
| N.º de células granzima B+ (média ± DP)  |   | 32,56 ± 44,67  | 52,52 ± 64,82  | 0,272  |

# DISCUSSÃO

Em consonância com a literatura, a avaliação das biópsias de lesões ulcerosas de indivíduos com LC evidenciou infiltrado inflamatório crônico, constituído principalmente por células CD68+ em ambos os grupos19, 20.

Embora a análise histopatológica tenha revelado níveis de inflamação e de necrose tissular semelhantes entre os grupos, a presença de granulomas é muito superior no grupo positivo, em concordância com a literatura. Os indivíduos com IDRM+ possuem maior ativação de células Th1, produtoras de IFN-γ. Essa citocina é extremamente importante para a ativação macrofágica, que promove o controle parasitário de fato21, 22. Macrófagos ativados provocam dano tecidual e tendem a formar granulomas ocasionalmente. Nos indivíduos com IDRM-, a menor ativação de células Th1 dificulta a formação granulomatosa por causa dos baixos níveis dessa citocina.

Também foi observada uma frequência maior de plasmócitos e células CD20+ (linfócitos B) nos indivíduos com IDRM-. Sendo a *L. braziliensis* um parasito intracelular, mecanismos de defesa humoral são ineficazes em seu controle23, 24. No entanto, esses tipos celulares já foram positivamente correlacionados à extensão de necrose tissular na LC25. É razoável supor que o dano tecidual, em indivíduos com LC, tenha participação de células plasmáticas e linfócitos CD20+, sobretudo nos indivíduos com IDRM-.

Os linfócitos T CD8+ estão mais presentes no grupo IDRM-, ainda que não se tenha encontrado significância estatística. A granzima B produzida por essas células tem um papel importante e reconhecido na patologia induzida pela *L. braziliensis*, promovendo a apoptose de células infectadas e lesão tecidual26. É possível que a maior ativação desses tipos celulares também esteja auxiliando a formação da necrose tissular observada nos indivíduos com IDRM-.

As células CD57+ também são produtoras de granzima B, porém elas se encontram em maior número nos indivíduos com IDRM+. Esperava-se que elas tivessem uma maior presença no grupo IDRM-, como as células CD8+. Uma explicação possível pode estar relacionada ao mecanismo de ativação desses tipos celulares, que é modulado por citocinas pró-inflamatórias, sobretudo a interleucina 2 (IL-2), mais abundantemente presentes em indivíduos com padrão de resposta inflamatória Th127.

Sendo a IL-1β uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos ativados2, 28, era esperado que ela fosse observada em maior quantidade nos indivíduos com IDRM+, o que não ocorreu. É plausível pensar que esse resultado está relacionado ao método de avaliação do tecido. A imuno-histoquímica permite apenas que se observe o conteúdo presente no meio intracelular e na membrana plasmática das células estudadas. Dessa forma, é possível que, no grupo positivo, as moléculas de IL-1β tenham sido secretadas em maior quantidade, o que explicaria os resultados obtidos. Uma avaliação precisa da presença dessa citocina no meio extracelular poderia ser feita a partir da extração de sangue dos participantes, porém esse não foi o objetivo deste estudo.

O número de amastigotas observadas nas biópsias de indivíduos negativos é significativamente superior ao do grupo IDRM+, como previamente descrito na literatura29. O melhor controle parasitário dos indivíduos com IDRM+ está positivamente associado ao número de granulomas e negativamente associado à presença de plasmócitos, em congruência com os achados histopatológicos supracitados.

Considerando que o presente estudo utiliza amostra de conveniência, é importante ressaltar que ele pode não representar com total precisão toda a população de indivíduos com LC. Todas as biópsias provieram do município de Presidente Tancredo Neves (BA), sugerindo que, ainda que caracterizem bem esses indivíduos, elas estão sujeitas a vieses possivelmente intrínsecos a essa população. Não há motivo, entretanto, para imaginar que o curso da LC seja diferente nos residentes de Corte de Pedra em relação a qualquer outro ser humano.

 É importante notar ainda que, por possuir um tamanho amostral diminuído, este estudo tem um poder estatístico reduzido. Isso significa que sua capacidade de detectar corretamente uma associação real é menor, quando comparada a estudos que contaram com uma maior amostra.

Por fim, como se trata de um estudo de corte transversal, não é possível inferir uma associação de causa e efeito entre a positividade à IDRM e a histopatologia dos pacientes. O desenho de estudo escolhido permite-nos obter dados confiáveis e formular hipóteses plausíveis baseando-se neles, porém uma associação causa-efeito deve ser verificada por meio de estudos do tipo caso-controle ou coorte.

# CONCLUSÃO

A diferença de padrões de resposta inflamatória entre pacientes com LC, verificada por meio da intradermorreação de Montenegro, aparentemente possui repercussões na histopatologia das úlceras leishmanióticas. Indivíduos com IDRM negativa tiveram maior presença de plasmócitos e amastigotas de *L. braziliensis*, porém uma quantidade inferior de granulomas.

O estado da arte sobre a histopatologia dos indivíduos com LC e IDRM negativa ainda é consideravelmente limitado. Dessa forma, o presente estudo faz-se importante por verificar, com certo nível de detalhamento, diferenças entre os achados histológicos observados nos grupos IDRM- e IDRM+, auxiliando, pois, a consolidar-se o conhecimento sobre a patogênese da LC no primeiro grupo.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. Vol. 3, Frontiers in Immunology. 2012. Acesso em: 25/09/2022;
2. Carvalho AM, Guimarães LH, Costa R, Saldanha MG, Prates I, Carvalho LP, et al. Impaired Th1 response is associated with therapeutic failure in patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. Journal of Infectious Diseases. 2021 fev 1;223(3):527–35. Acesso em: 25/09/2022;
3. Muniz AC, Bacellar O, Lima Lago E, Carvalho AM, Carneiro PP, Guimarães LH, et al. Immunologic markers of protection in *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection: A 5-year cohort study. Journal of Infectious Diseases. 2016 ago 15;214(4):570–6. Acesso em: 25/09/2022;
4. Organização Mundial da Saúde. Leishmaniasis: epidemiology and access to medicines. Genebra, Suíça, OMS; 2013. Acesso em: 25/09/2022;
5. Ministério da Saúde. DATASUS: Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação - Brasil. Departamento de Informática do SUS. Brasília, Ministério da Saúde, 2020. Acesso em: 25/09/2022;
6. Organização Pan-Americana da Saúde. Sistema de informação regional de leishmanioses. Washington, D.C., EUA; OPAS, 2021. Acesso em: 25/09/2022;
7. Christensen SM, Belew AT, El-Sayed NM, Tafuri WL, Silveira FT, Mosser DM. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by L.

amazonensis. PLoS Negl Trop Dis. 2018 mar 1;13(3). Acesso em: 25/09/2022;

1. Ferreira Rangel E, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(7):937–54.. Acesso em: 25/09/2022;
2. Montenegro J. CUTANEOUS REACTION IN LEISHMANIASIS. Arch Derm

Syphilol [Internet]. 1926;187–94. Disponível em: http://archderm.jamanetwork.com/ Acesso em: 25/09/2022;

1. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. Vol. 392, The Lancet. Lancet Publishing Group; 2018. p. 951–70. Acesso em: 02/11/2022;
2. Bailey MS, Lockwood DNJ. Cutaneous leishmaniasis. Clin Dermatol. 2007 mar;25(2):203–11. Acesso em: 02/11/2022;
3. Aronson NE, Joya CA. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. Vol. 33, Infectious Disease Clinics of North America. W.B. Saunders; 2019. p. 101–17. Acesso em: 02/11/2022;
4. Arenas R, Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J. Leishmaniasis: A review. Vol. 6, F1000Research. Faculty of 1000 Ltd; 2017. Acesso em: 02/11/2022;
5. Vera-Izaguirre DS, Vega-Memije E, Quintanilla-Cedillo MR, Arenas R. Leishmaniasis. Revisión. Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica. 2006;4(4):252–60. Acesso em: 02/11/2022;
6. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infectious Diseases. 2007 set;7(9):581–96. Acesso em: 02/11/2022;
7. Carstens-Kass J, Paulini K, Lypaczewski P, Matlashewski G. A review of the leishmanin skin test: A neglected test for a neglected disease. Vol. 15, PLoS Neglected Tropical Diseases. Public Library of Science; 2021. Acesso em: 02/11/2022;
8. Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. Vol. 73, Journal of the American Academy of Dermatology. Mosby Inc.; 2015. p. 911–26. Acesso em: 05/11/2022;
9. Gurel MS, Tekin B, Uzun S. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. Clin Dermatol. 2020 mar 1;38(2):140–51. Acesso em: 05/11/2022;
10. Saldanha MG, Queiroz A, Machado PRL, Carvalho LP, Scott P, Carvalho Filho EM, et al. Characterization of the histopathologic features in patients in the early and late phases of cutaneous leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 8 de março de 2017;96(3):645–52. Acesso em: 03/08/2023;
11. Ribeiro CS, França RR, Silva JA, Silva SC da, Uliana SRB, Boaventura VS, et al. Cellular infiltrate in cutaneous leishmaniasis lesions and therapeutic outcome. An

Bras Dermatol. 1o de setembro de 2021;96(5):544–50. Acesso em: 03/08/2023;

1. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. Nat Rev Immunol. 25 de agosto de 2016;16(9):581–92. Acesso em: 03/08/2023;
2. Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, Carvalho LP, Glennie ND, Passos S, et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of leishmania braziliensis by reactive oxygen species. J Infect Dis. 15 de abril de 2014;209(8):1288–96. Acesso em: 03/08/2023;
3. Carvalho EM, Barral A, Costa JML, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. Acta Trop. 10 de dezembro de 1994;56:315–25. Acesso em: 03/08/2023;
4. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, De Jesus AR, Dutra WO, et al. Upregulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. Infect Immun. dezembro de 2002;70(12):6734–40. Acesso em: 03/08/2023;
5. Ridley DS. The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1979;73(2):150–60. Acesso em: 03/08/2023;
6. Hiebert PR, Granville DJ. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. Trends Mol Med. dezembro de 2012;18(12):732–41. Acesso em: 05/09/2023;
7. Bogdan C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. Front Cell Infect Microbiol. 29 de maio de 2012;2. Acesso em: 05/09/2023;
8. Saldanha MG, Pagliari C, Queiroz A, Machado PRL, Carvalho L, Scott P, et al. Tissue Damage in Human Cutaneous Leishmaniasis: Correlations Between Inflammatory Cells and Molecule Expression. Front Cell Infect Microbiol. 14 de julho de 2020;10. Acesso em: 05/09/2023;
9. Krolewiecki AJ, Almazan MC, Quipildor M, Juarez M, Gil JF, Espinosa M, et al. Reappraisal of Leishmanin Skin Test (LST) in the management of American Cutaneous Leishmaniasis: A retrospective analysis from a reference center in Argentina. PLoS Negl Trop Dis. 5 de outubro de 2017;11(10). Acesso em:

05/09/2023.