



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO

EM CIENCIAS DA SAÚDE



**MANIFESTAÇÕES ATÍPICAS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM ÁREA DE
TRANSMISSÃO DE *LEISHMANIA VIANIA BRAZILIENSIS*: ASPECTOS CLÍNICOS,
IMUNOLÓGICOS E PARASITOLÓGICOS.**

Luiz Henrique Santos Guimarães

Tese de doutorado

Salvador (Bahia), 2014

G963 Guimarães, Luiz Henrique Santos

Manifestações atípicas de leishmaniose tegumentar em área de transmissão de *Leishmania Viania braziliensis*: aspectos clínicos, imunológicos e parasitológicos / Luiz Henrique Santos Guimarães. – Salvador, 2014.

82 f.

Orientador: Prof. Dr. Nicolaus Albert Borges Schriefer

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia, 2013.

1. Leishmaniose. 2. Imunologia. 3. Parasitologia. 4. Genética. I. Schriefer, Nicolaus Albert Borges. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.993.161



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE**



MANIFESTAÇÕES ATÍPICAS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM ÁREA DE TRANSMISSÃO DE *LEISHMANIA VIANIA BRAZILIENSIS*: ASPECTOS CLÍNICOS, IMUNOLÓGICOS E PARASITOLÓGICOS.

Luiz Henrique Santos Guimarães

Professor-orientador: Albert Schriefer

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Salvador (Bahia), 2014

COMISSÃO EXAMINADORA:

- Profa. Anette Chrusciak Talhari (Fund. de Med. Tropical do Amazonas - Manaus).
- Prof. Heitor Gonçalves (Hosp. Dona Libânia - Fortaleza, Ceará).
- Profa. Jussamara Brito (Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública)
- Prof. Paulo Roberto Lima Machado (Programa de pos-graduação em ciências da saúde - PPGCS).
- Prof. Argemiro D'Oliveira Junior (Programa de pos-graduação em ciências da saúde - PPGCS).

Para Juracy Santos Guimarães

Poema de Natal

Para isso fomos feitos:
Para lembrar e ser lembrados
Para chorar e fazer chorar
Para enterrar os nossos mortos —
Por isso temos braços longos para os adeuses
Mãos para colher o que foi dado
Dedos para cavar a terra.
Assim será nossa vida:
Uma tarde sempre a esquecer
Uma estrela a se apagar na treva
Um caminho entre dois túmulos —
Por isso precisamos velar
Falar baixo, pisar leve, ver
A noite dormir em silêncio.
Não há muito o que dizer:
Uma canção sobre um berço
Um verso, talvez de amor
Uma prece por quem se vai —
Mas que essa hora não esqueça
E por ela os nossos corações
Se deixem, graves e simples.
Pois para isso fomos feitos:
Para a esperança no milagre
Para a participação da poesia
Para ver a face da morte —
De repente nunca mais esperaremos...
Hoje a noite é jovem; da morte, apenas
Nascemos, imensamente.

Vinicius de Moraes

EQUIPE:

- Adriano Queiroz Silva, Mestre e Doutor, Universidade de Berkeley.
- Ednaldo Lima do Lago, técnico em saúde, Centro de Referência em Leishmaniose, Corte de Pedra.
- Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Mestre e Doutor, Faculdade de Medicina da Bahia – UFBA.
- Juliana Almeida Silva, Mestre e Doutoranda do PPGCS.
- Marcus Miranda Lessa, Mestre e Doutor, Serviço de Otorrinolaringologia, COM-HUPES.
- Maria Neusa Sousa Lago, Enfermeira, Centro de Referência em Leishmaniose, Corte de Pedra.
- Maria Odônio Ferreira, auxiliar técnica, Centro de Referência em Leishmaniose, Corte de Pedra.
- Maria Olivia Bacellar, Mestre e Doutora, Serviço de Imunologia, COM-HUPES.
- Nicolaus Albert Borges Schriefer, Mestre e Doutor, Serviço de Imunologia, COM-HUPES.
- Paulo Roberto Lima Machado, Mestre e Doutor, Serviço de Imunologia, COM-HUPES.
- Silvana Conceição da Silva, Mestre e doutoranda do PPGCS

- Thiago Marconi, Mestre e Doutor, Serviço de Imunologia, COM-HUPES.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES:

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Faculdade de Medicina da Bahia

Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos (COM-
HUPES)

Serviço de Imunologia

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz

Fontes de Financiamento:

1 National Institutes of Health (NIH) grant AI 30639

2 Bolsa de estudo Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	11
ÍNDICE DE GRÁFICOS	12
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE SIGLAS	14
RESUMO	15
SUMMARY	16
INTRODUÇÃO	17
JUSTIFICATIVA	30
METODOLOGIA	32
CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	32
RESULTADOS	40
DISCUSSÃO	51
CONCLUSÕES	56
PROPOSTAS DE ESTUDOS	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	
ARTIGO 1	

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes com LCA	41
Tabela 2. Comparação da frequência dos haplótipos com 3 SNPs	43
Tabela 3. Comparação da frequência dos haplotipos com 5 SNPs	43
Tabela 4. Comparação da frequência dos haplótipos com 2 SNPs	44
Tabela 5. Comparação dos dados clínicos pacientes avaliados imunologicamente	45

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Procução de INF - γ	46
Grafico 2	Produção de TNF - α	46
Gráfico 3	Produção de IL-10	47
Gráfico 4	Produção de IL-17	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Mapa do estado da Bahia e área endêmica de Corte de Pedra	33
Figura 2	Padrões eletroforéticos de amplicons gerados a partir do DNA genômico de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	36
Figura 3	Foto de satélite da região de Corte de Pedra	42
Figuras 4a e b	Fotos de lesões de paciente gestantes	48
Figuras 5a e b	Fotos de lesões de paciente com AIDS/LCA	51

ÍNDICE DE SIGLAS

INF-γ	Interferon - gama
TNF-α	Do inglês Tumor necrosis factor alpha
LCA	Leishmaniose cutânea atípica
LC	Leishmaniose cutânea
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LM	Leishmaniose Mucosa
LD	Leishmaniose Disseminada
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
CD8	Do ingles cluster of differentiation 8
CD4	Do ingles cluster of differentiation 4
Tia-1	Do ingles T-cell intracellular antigen-1
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
PCR	Do ingles Polymerase Chain Reaction
LIT	Do ingles Liver Infusion Triptose
NNN	Do ingles Neal, Novy, Nicolle
RAPD	Do ingles Random Amplified Polymorphic DNA
DMSO	Dimetilsulfóxido
GPS	Do ingles Global Positioning System
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
ELISA	Do ingles Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
NASBA	Do ingles Nucleic Acid Sequence Based Amplification

Resumo

MANIFESTAÇÕES ATÍPICAS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM ÁREA DE TRANSMISSÃO DE *LEISHMANIA VIANIA BRAZILIENSIS*: ASPECTOS CLÍNICOS, IMUNOLÓGICOS E PARASITOLÓGICOS. A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, cuja forma clássica é caracterizada por úlcera de bordas elevadas. Apesar da forma clássica, formas atípicas vêm sendo esporadicamente relatadas. **Objetivo:** Descrever os aspectos clínicos e imunológicos dos portadores dessa variante da patologia, bem como avaliar a genética dos parasitas isolados. **Metodologia:** Para tanto foram coletados dados clínicos, sangue periférico para avaliação da resposta imune. Parasitas foram obtidos dos pacientes com leishmaniose cutânea atípica (LCA), que tiveram seus endereços mapeados geograficamente. **Resultados:** Em dois períodos 2005/2006 e 2008 – 2012 foram incluídos 69 pacientes atípicos, sendo 02 pacientes portadores de Síndrome da Imunodeficiência adquirida (AIDS), 16 pacientes gestantes e 51 não possuíam fator de risco aparente para atipia. Estes pacientes, quando comparados com portadores de leishmaniose cutânea (LC), não possuem distribuição geográfica distinta ($P= 0,258$), apresentaram maior proporção de lesões acima da linha da cintura 94,1 x 33,3% ($P=0,0001$) e de falha ao antimonial 41 x 0% ($P=0,0006$). Imunologicamente apresentaram menor produção de TNF- α (média 316,5 X 1906,1 X pg/ml; $P= 0,0001$) e de IFN- γ (média 747,1 X 4445,9 pg/ml; $P=0,0002$), porém produzem mais IL-10 (média 392,8 X 171,9 pg/ml; $P=0,0006$) e IL-17 (média 218,4 X 69,4 pg/ml; $P=0,0008$). Os parasitas isolados dos pacientes com LCA apresentam polimorfismos em proporções distintas dos isolados de LC, quando comparada à mesma região do genoma, bem como apresentam polimorfismos que não foram identificados nos isolados de LC. Portanto os pacientes portadores de LCA, apesar de residirem na mesma área dos portadores de LC, são clinicamente distintos e também apresentam resposta imune diversa. **Conclusões:** Os parasitas isolados dos pacientes com LCA são geneticamente distintos dos isolados de LC e podem representar uma cepa específica que determina uma forma de LT, com clínica, resposta imunológica distinta, e que representam um desafio tanto quanto ao diagnóstico, tanto quanto terapêutico.

1leishmaniose; 2 imunologia; 3 parasitologia; genética

Summary

ATYPICAL MANIFESTATIONS OF TEGUMENTARY LEISHMANIASIS IN AREA OF TRANSMISSION *LEISHMANIA VIANIA BRAZILIENSIS*: CLINICAL, IMMUNOLOGICAL AND PARASITOLOGICAL ASPECTS. The cutaneous leishmaniasis (CL) is a non-contagious infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, whose classical form is characterized by ulcers with elevated borders. Despite the classic form, atypical forms have been sporadically reported. **Objective:** The purpose of this study is describe the clinical and immunological aspects of the carriers of this variant of the disease, as well as evaluating the genetics of isolated parasites. **Methods:** Clinical data and peripheral blood were obtained to evaluation of immune response. Parasites were obtained from patients with atypical cutaneous leishmaniasis (ACL), who had their addresses mapped geographically. **Results:** In two periods 2005/2006 and 2008 – 2012, 69 atypical patients were included, 02 patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), 16 pregnant patients and 51 without apparent risk factor for atypia. These patients, when compared with cutaneous leishmaniasis (CL), do not have distinct geographical distribution (Cusick&Edward test $P = 0.258$), had higher proportion of lesions above the waist line $94.1 \times 33.3\%$ ($P = 0.0001$) and fails to antimony $41 \times 0\%$ ($P = 0.0006$). Immunologically showed lower production of TNF - α (average 316.5×1906.1 pg/ml, $P = 0.0001$) and IFN- γ (average 747.1×4445.9 pg/ml, $P = 0.0002$), however, produce more IL -10 (average 392.8×171.9 pg / ml, $P = 0.0006$) and IL -17 (average 218.4×69.4 pg / ml, $P = 0.0008$). Parasites isolated from patients with polymorphisms present in different proportions of isolates of CL compared to the same region of the genome, as well as have polymorphisms that were not identified in the isolated LC. **Conclusions:** Therefore patients with ACL, despite residing in the same area of patients with LC, are clinically distinct and also have diverse immune response. The parasites isolated from patients with LCA are genetically distinct isolates of LC and may pose a particular strain that causes a form of LT, with clinically distinct immunologic response, and represent a challenge to diagnosis, as well as therapeutic.

1. leishmaniasis; 2. immunology; 3. parasitology; 4. genetics

II. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, com uma incidência de 1.000.000 a 1.500.000 de casos no mundo, sendo o Brasil, juntamente com Afeganistão, Argélia, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, responsáveis por cerca de 90% dos casos de LT no mundo (Desjeux 2004). Classicamente, as leishmanioses são divididas em leishmaniose do velho mundo, incluindo os casos que ocorrem na África, Europa e Ásia e a leishmaniose tegumentar americana (LTA), que engloba os casos oriundos das Américas (Murray et al. 2005).

A LTA representa um conjunto de doenças com características clínicas, imunológicas e patológicas distintas, cuja expressão depende de fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro. A doença tem uma ampla distribuição no território brasileiro, ocorrendo casos em todas as regiões geográficas. A variedade de vetores e a existência de diferentes ambientes geográficos, com suas respectivas características de clima e vegetação (Lainson 1983; Costa et al. 2007), tornam a leishmaniose no Brasil uma doença de múltiplas facetas, com diferenças no tocante a apresentação clínica e resposta ao tratamento, que dificultam a homogeneização de métodos diagnósticos e terapêuticos. Os principais parasitos implicados na leishmaniose tegumentar no Brasil são *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e a *Leishmania (L.) amazonenses* (Ministério da Saúde 2007).

No Brasil, são reconhecidas 04 formas clínicas distintas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose disseminada (LD) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). Enquanto na região amazônica a infecção por *L.(V.) guyanensis* é a mais prevalente (Ministério da Saúde) normalmente se associa com lesão cutânea com raro envolvimento mucoso (Neves et al. 2010), a *L (V.) braziliensis* é responsável pelas formas mais graves da doença, incluindo forma mucosa (Jones et al. 1987; Walton

1987), com exceção da forma anérgica difusa, cujo único agente descrito em nosso país é a *L.(L.) amazonensis* (Barral et al. 1995).

A forma clínica mais prevalente é a lesão clássica de LC, e essas lesões representadas por úlceras de bordas elevadas e fundo granuloso ocorrem principalmente em membros inferiores (Llanos-Cuentas et al. 1984). A leishmaniose mucosa é documentada em cerca de 3% dos pacientes com leishmaniose cutânea, podendo a doença mucosa aparecer concomitantemente à doença cutânea, ou meses a anos após a lesão cutânea (Marsden 1986; Lessa et al. 2007). A doença acomete em quase sua totalidade de casos a mucosa nasal. As lesões mucosas são caracterizadas inicialmente por nódulos e ulcerações superficiais, posteriormente úlcera profunda, que pode evoluir para destruição do septo nasal e deformidade da pirâmide nasal (Lessa et al. 2007). Além da mucosa nasal, faringe e laringe podem ser acometidas, podendo levar a comprometimento das cordas vocais e obstrução de trato respiratório superior (Costa et al. 1986). A gravidade da doença é definida por cinco estágios, variando do estágio I, quando a mucosa nasal apresenta apenas nodulações em sua superfície, até o estágio V, quando apresenta ampla destruição tecidual com deformação da pirâmide nasal (Lessa et al. 2012). A LCD se caracteriza pela presença de lesões infiltradas, nodulares, não ulceradas, de difícil terapêutica e que se relaciona com a ausência de resposta imune do hospedeiro (Barral et al. 1995). A LD é descrita como a presença de 10 ou mais lesões ulceradas, acneiformes, papulares em áreas não contíguas da superfície corporal e que vem aumentando o número de casos nos últimos 20 anos. (Turetz et al. 2002) Geralmente, estes pacientes apresentam história de febre precedendo à disseminação da doença, sugerindo uma via hematogênica para esta disseminação e histologicamente apresenta infiltrado mononuclear com presença de linfócitos e macrófagos e poucos parasitas (Carvalho et al. 1994).

Resposta imune

A resposta imune tem um importante papel na patogênese da leishmaniose tegumentar. As quatro formas clínicas descritas da doença LC, LM, LD e LCD têm sido estudadas e caracterizadas apresentando perfis imunológicos diferentes (Pirmez et al. 1993; Bonfim et al. 1996; De Jesus et al. 1998). Por ser a leishmania um organismo intracelular obrigatório, o principal mecanismo de defesa contra este parasito é a produção de INF- γ , necessária para ativação de macrófagos e síntese de derivados do O₂ a exemplo do óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Scott et al. 1983; Da-Cruz et al. 1996). Modelos experimentais de leishmaniose evidenciam que a produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α , resposta Th1, que é observada em camundongos C57Bl-6, está relacionada à resistência ao patógeno e cura espontânea da lesão, enquanto que a resposta tipo Th2, que se caracteriza pela produção de IL-4 e IL-5, que é observada em camundongos BALB/c, está relacionada à susceptibilidade à doença e proliferação do parasito (Sher et al. 1983; Scott et al. 1988; Scott et al. 1989). Estes modelos animais, apesar de colaborarem para o conhecimento da patogênese da leishmaniose tegumentar, não elucidam questões importantes sobre a patologia no homem, pois níveis elevados de citocinas inflamatórias observados na leishmaniose cutânea e mucosa estão associados a dano tecidual (de Jesus et al 1998; Bacellar et al. 2002) e a diminuição ou a ausência da produção destas citocinas está relacionada com a proliferação e disseminação de parasitos, que caracteriza a leishmaniose difusa (Barral et al. 1995). Reforça o importante papel da resposta imune na expressão da doença, a evidência que poucos parasitos são encontrados nas lesões cutâneas e mucosas juntamente com um intenso infiltrado inflamatório (Machado et al. 2002; Faria et al 2005), associado ao fato que, pacientes que são tratados em fase inicial da doença progridem com desenvolvimento de lesões. Além disso, nestas lesões verifica-se a presença de vasculite e marcador de

citotoxicidade (Tia-1) (Machado et al 2002, Unger et al. 2009). Como acontece em outras doenças infecto-parasitárias, existem indivíduos que desenvolvem uma resposta imune contra o parasito, porém não desenvolvem a doença, como foi demonstrado em uma área com casos de leishmaniose tegumentar na Bahia. Estes indivíduos montam uma resposta imune balanceada, com produção de citocinas pro-inflamatórias, o que garante um controle dos parasitos, contudo num nível menor do que aqueles pacientes que desenvolvem lesão cutânea, evitando assim o dano tecidual (Follador et al. 2002). Os pacientes portadores de leishmaniose mucosa produzem altos níveis de IFN- γ e TNF- α quando comparados com portadores leishmaniose cutânea e *in vitro* esta resposta não é apropriadamente modulada pela adição de IL-10 a cultura de células mononucleares de sangue periférico (Bacellar et al. 2002). Esta resposta imune exacerbada pode estar relacionada com a predisposição genética do paciente, para produzir maiores quantidades de citocinas inflamatórias, através de polimorfismo genético (Cabrera et al. 1995).

Do ponto de vista imunológico, pacientes portadores de leishmaniose disseminada, apresentam menor produção de IFN- γ e TNF- α , quando comparados com pacientes portadores de leishmaniose cutânea e níveis mais elevados dessas citocinas quando comparados com pacientes portadores de leishmaniose difusa, situando-se imunologicamente entre estas duas formas clínicas (Carvalho et al. 1994; Turetz et al. 2002).

A forma difusa da leishmaniose tegumentar está associada à *L. (L.) amazonensis* e histologicamente, estes pacientes apresentam macrófagos abarrotados de leishmania, e estes macrófagos são incapazes de matar o parasito (Bittencourt & Freitas 1983). Estes pacientes, quando são avaliados imunologicamente, apresentam negatividade do teste de Montenegro, baixa ou ausência de resposta linfoproliferativa e ausência de produção de

IFN- γ para antígeno de leishmania (Bryceson 1970). Através da avaliação de RNA mensageiro para citocinas, demonstrou-se que células mononucleares de pacientes com leishmaniose difusa expressam grandes quantidades de IL-10 e IL-4 e baixas quantidades IFN- γ , durante a fase ativa da doença e após a terapêutica e atenuação das lesões, a expressão de IL-10 diminui e a expressão de IFN- γ aumenta (Bonfim et al. 1996).

Patogênese da LTA

É conhecido que o desenvolvimento da leishmaniose é dependente de fatores do hospedeiro, tais como resposta imune e genética, e do parasito. A resposta imune do tipo 1, caracterizada por maior produção de IFN- γ e TNF- α , é importante para a destruição e controle da disseminação do parasito, desde que a ausência dessa produção leva à incapacidade de destruir parasitos, o que resulta no aparecimento da forma difusa da doença (Barral et al. 1995). Foi também observado que indivíduos com leishmaniose tegumentar e que têm intradermorreação de Montenegro (IDRM) negativa apresentam pior prognóstico (Marsden 1986) e que se alteram as concentrações de citocinas produzidas e a responsividade a essas substâncias pelas células T de pacientes, durante a doença e após a cura (Pirmez et al 1993; Coutinho et al. 1996). Todavia, pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa têm grande produção dessas citocinas e presença de poucos parasitos, mas desenvolvem lesão tecidual. Como nesses casos a modulação da resposta imune não é feita de modo apropriado (Bacellar et al. 2002), o intenso processo inflamatório termina por levar a lesão tecidual (de Jesus et al. 1998). Sustenta a hipótese do papel da resposta imune do hospedeiro em causar dano tecidual, a observação de que em indivíduos identificados em uma fase inicial da doença, ainda sem úlcera, mesmo com o tratamento adequado, o antimônio não impede o desenvolvimento da lesão (Machado et al. 2002). Diferentemente, as infecções por *L. (V.) guyanensis* produzem

infecções com úlceras semelhantes, porém com resposta imune celular e humoral e menos intensa, o que justificaria a maior quantidade de parasitos na lesão (Matta et al. 2009) e maior tendência a falha com antimonial (Neves et al. 2011).

Parasitos também podem interferir na gravidade da doença e induzir formas clínicas diferentes de leishmanioses. Por exemplo, a *L. amazonensis* tanto pode causar doença cutânea e mucosa como também a leishmaniose cutânea difusa e a leishmaniose visceral (Barral et al. 1991). Mais recentemente, nós documentamos que existem polimorfismos genéticos nos parasitos isolados de pacientes da região de Corte de Pedra (Estado da Bahia) e que estas variantes genéticas se relacionavam com diferentes formas clínicas da doença (Schriefer et al. 2004). Diferenças fenotípicas entre isolados de *L (V.) braziliensis* de pacientes da área endêmica também foram evidenciadas mostrando que *in vitro* isolados de *L (V.) braziliensis* podem ser susceptíveis ou resistentes à ação de óxido nítrico e em estudo não controlado e preliminar foi observada a tendência para associação entre resistência *in vitro* ao óxido nítrico e maior tamanho da lesão e falta de resposta ao antimonial (Giudice et al. 2007). Não pode também ser descartado que a maior resistência ao óxido nítrico facilitaria a persistência do parasito, o que seria um fator estimulador e mantenedor de uma resposta imunológica exacerbada. Outro fator importante é o fato de isolados de *L (V.) braziliensis* oriundos de Corte de Pedra e de pacientes com diferentes formas clínicas promovem níveis diferentes de citocinas, quando usados para estimulação de células mononucleares de pacientes (Leopoldo et al. 2006). A plasticidade dos integrantes destas espécies tem conferido poder adaptativo a diversas condições ambientais, que representam diferentes climas, vegetações, reservatórios e vetores, o que justifica a distribuição da doença por todas as regiões do país (Costa J 2005; Costa et al. 2007). Entretanto, a mesma espécie de parasito pode estar relacionada com diferentes formas clínicas da leishmaniose, com variação de

gravidade e de resposta terapêutica, o que sugere que esta plasticidade parasitária pode ocorrer também ao nível intraespecífico (Schriefer 2004). A variabilidade de comportamento das cepas de *Leishmania sp.* nos trabalhos experimentais tem sido acompanhada pela identificação de um grande polimorfismo entre esses microorganismos no campo, em estudos que têm buscado correlacionar isolados naturais e apresentações da doença humana (Saravia et al. 1998; El Tai et al. 2001).

Adicionalmente, não podemos descartar que fatores ambientais possam interferir na apresentação da leishmaniose. Já foi proposto em países da América Central que cinzas vulcânicas estão relacionadas com formas atípicas de leishmaniose, uma vez que em análise de microscopia confocal foram encontradas cristais de cinzas vulcânicas encrustadas em lesões atípicas de pacientes, quando comparados com pacientes com lesões clássicas destes países (Convit et al. 2006).

Leishmaniose tegumentar americana na região de Corte de Pedra

O primeiro estudo epidemiológico na região de Corte de Pedra (Jones et al. 1987) evidenciou que a forma cutânea localizada corresponde a 97,3% dos casos de leishmaniose tegumentar observados na vila de Três Braços/BA, que é contígua à região de Corte de Pedra, e nesta região, *L. (V.) braziliensis* é responsável por quase a totalidade dos casos. Um estudo prospectivo nesta região mostrou que em 74% dos pacientes a doença manifestou-se com ulceração clássica e única, enquanto em 26% havia presença de duas ou mais lesões. Nestes pacientes, a localização mais comum das lesões foi nos membros inferiores (73%), seguida de membros superiores (11%), tronco (10%), cabeça e pescoço (5%) e nariz (1%), acometendo, predominantemente, adultos de sexo masculino. A fase inicial da doença se caracteriza por uma pápula ou nódulo seguido de ulceração superficial, habitualmente acompanhada de exuberante adenomegalia regional indolor maior que 3 cm, documentada em 85% dos casos

(Machado et al. 2002). Em um estudo no qual uma busca ativa de casos em fase inicial da doença foi realizada, em familiares de pacientes com leishmaniose cutânea, foi relatado o isolamento de *L. braziliensis* em 10 pacientes da região de Corte de Pedra, onde a linfadenopatia sem lesão cutânea foi detectada, com 7 desses pacientes evoluindo com ulceração cutânea posteriormente (Barral et al. 1995).

Recentemente Jirmanus et al. 2012, evidenciaram que nos últimos 20 anos (1998 -2008) 12424 pacientes foram diagnosticados com LTA em Corte de Pedra. Destes, 93,3% tinham LC, 4,3% tinham LM e 2,4% tinham LD. Estes pacientes tinham idade média de 22 anos, o gênero masculino foi predominante correspondendo a 64,6% dos casos e 47,6% eram os trabalhadores rurais.

Em 1986, foi descrita na Bahia uma forma diferente de leishmaniose tegumentar, denominada leishmaniose disseminada, que se caracteriza por apresentar diversas lesões cutâneas em várias partes do corpo (Costa et al. 1986). A leishmaniose disseminada está nesta região relacionada com *L (V.) braziliensis* e se caracteriza pela presença de múltiplas lesões ulceradas, papulosas e acneiformes em vários segmentos do corpo, variando de 75 a 800 lesões (Carvalho et al. 1994). Tipicamente, estes pacientes iniciam sua patologia com uma lesão ulcerada e após alguns dias ou semanas de evolução apresentam quadro febril e astenia, associado ao surgimento de lesões em diferentes partes do corpo, sugerindo que ocorra disseminação hematogênica do parasito. Enquanto na lesão cutânea clássica cerca de 3% dos casos evoluem com comprometimento de mucosa nasal, cerca de 40% dos pacientes com leishmaniose disseminada apresentam concomitantemente lesão mucosa (Turetz et al. 2002). Na década de 1980, esta forma da doença era rara na área endêmica de Corte de Pedra/BA e representava cerca de 0,2% dos casos de leishmaniose tegumentar, com registro de aumento para 1,9% dos casos na década de 1990. Outro aspecto importante na leishmaniose disseminada reside no fato

destes pacientes apresentarem rápida regressão da maioria das lesões após início do tratamento, porém, raramente a cura é atingida com apenas um curso de antimonial (Turetz et al. 2002).

Em estudos realizados em áreas endêmicas de leishmaniose, há relatos da presença de cerca de 10% da população que apresentam teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de leishmania positivo, mesmo sem a presença de doença ativa ou pregressa, e são classificados como subclínicos (Badaro et al. 1986). Em estudo realizado em Canoas, na zona rural do município de Santo Amaro – BA, foi observado que dentro da população estudada ocorreram num período de 03 anos de acompanhamento, 29 casos ativos de leishmaniose cutânea e 104 de indivíduos com teste de Montenegro positivo, sem evidência de leishmaniose ativa ou cicatrizes sugestivas de leishmaniose. Neste estudo, os indivíduos com infecção subclínica apresentavam idade menos elevada e a área endurecida do teste de Montenegro era significativamente menor do que os pacientes que desenvolviam lesões cutâneas (Follador et al. 2002). Na região de Corte de Pedra, 17,5% dos indivíduos moradores da mesma casa de pacientes com LC, apresentavam evidências imunológicas de infecção por *Leishmania sp.* sem no entanto, apresentarem sinais de doença atual ou pregressa (Schnorr et al. 2012).

Manifestações atípicas de LT no mundo e no Brasil.

Na literatura médica, diversos relatos de casos atípicos foram feitos ao redor do mundo. Alguns trabalhos tentam correlacionar estes casos a fatores do parasito, comparando espécies, alguns correlacionam fatores do hospedeiro, como resposta imune e comorbidades e outros citam fatores ambientais. Na Argélia, foram relatados casos de pacientes com lesões lupóides, que, segundo o autor, iniciam-se com um nódulo que se espalha em placa semelhante ao lupus discoide (Ysmail-Dahlouk et al. 1994). Fato também relatado na Turquia (Ferahbaş et al. 2006), e na Tunísia (Masmoudi et al 2007),

onde o autor relata que essa forma de apresentação ocorre em 15,7% dos casos, ao lado de lesões semelhantes à esporotricóide, que ocorre em 18,6% dos pacientes com leishmaniose. No Paquistão foi relatada numa região de transmissão de *L major*, a incidência de 2% de pacientes com lesões atípicas de um total de 1.709 pacientes vistos (Raja et al. 1998). Estas lesões são descritas como paroniquiais, cancróide, anular, palmo plantar, erisipelóide e zosteriforme, forma também descrita no Irã (Omidian & Mapar 2006). Ainda no Paquistão, foi reportado um caso de uma paciente com lesão semelhante a panarício em dedo médio de mão direita, com posterior surgimento de lesões nodulares em membro superior direito, que evoluíram com ulceração, formando lesões semelhantes à esporotricose e, segundo o autor, as lesões foram causadas por *L tropica* (Iftikhar et al. 2003). A face parece ser o local mais acometido em relatos oriundas da Ásia e a forma erisipelóide é mais relatada. No Irã, cinco pacientes foram relatados com a forma erisipelóide em face e estes casos foram relacionados à *L. tropica* (Salmanpour et al. 1999). Ainda no Irã em um centro de referência, após análise de 1250 casos em um período de dois anos, os autores relacionaram a forma erisipelóide a pessoas de meia-idade e mulheres idosas (Momeni & Aminjavaheri 1994). Na Síria em uma revisão de 12 anos de atendimento, os autores classificaram 1750 pacientes como portadores de lesão cutânea crônica, relatam uma frequência de 92% de lesões em face e relatam que o diagnóstico diferencial com Lupus, Síndrome de Sweet, psoríase, sarcoidose e erisipela (Douba et al. 2012).

No Continente Europeu, onde as leishmanioses tegumentar e visceral estão relacionadas à *L. infantum*, os relatos de casos atípicos estão associados à coinfeção *Leishmania* com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Exceções para relato de um caso na Itália, de paciente HIV-soronegativo, com múltiplas lesões de grande tamanho, que usou corticóide tópico (Paradisi et al. 2005). Na Sicília, de 50 pacientes diagnosticados com

leishmaniose cutânea, 20 (40%) destes foram considerados como portadores de lesões não usuais, eram imunocompetentes e apresentavam lesões erisipelóides, zoosteriforme e lupóides. Estes casos estavam relacionados a *L. Infantum zimodema* Montpellier MON-24 (Bongiorno et al. 2009). Há o relato de dois casos de pacientes do sexo masculino, na Inglaterra, que desenvolveram lesões descritas como placas ulceradas, após uso de metotrexate, para controle de doenças reumatológicas (Saha et al. 2006). Em Portugal foi descrito o caso de um homem de 66 anos, portador de diabetes melitus tipo 2 com uma placa eritematosa em face, infiltração labial e obstrução nasal e que teve como diagnóstico diferencial linfoma, micose subcutânea, granulomatose de Wergener e lúpus vulgar. Foi diagnosticado como portador de leishmaniose cutânea causada por *L. infantum* genótipo B (Lopes et al. 2013).

Na Guiana Francesa, há relato de um caso de uma paciente jovem com lesão em quirodático semelhante a panarício, que foi tratado cirurgicamente por várias vezes, até o diagnóstico de leishmaniose tegumentar (Lescure et al. 2002). Na América Central, aventaram a possibilidade de influência de fatores ambientais na presença de lesões cutâneas atípicas de pacientes (Convit et al 2005), considerando o achado de partículas inorgânicas em microscopia confocal de biopsias de pacientes com lesões atípicas oriundos da Costa Rica e Nicarágua e, analisa lesões de pacientes de Honduras, Nicarágua e Guatemala, onde também ocorre inclusão de partículas inorgânicas em lesões atípicas de leishmaniose, fato que o autor relaciona ao vulcanismo de certas regiões da América Central (Convit et al. 2006). Existem relatos de casos atípicos no Equador, onde se descreveram o achado de três casos atípicos num total de 131 pacientes vistos em dois anos, sendo um caso de disseminada, um caso erisipelóide e um caso de recidiva cútis, ocorridos em crianças de 01, 05 e 06 anos, respectivamente (Calvopina et al. 2005). Também na América Central, pacientes com lesões atípicas

provenientes de áreas endêmicas de Honduras e Costa Rica foram avaliados observando-se o número total de linfócitos, bem como suas subpopulações CD4 e CD8 e comparados com pacientes com lesões típicas e indivíduos sem leishmaniose. Demonstrou-se que indivíduos sadios possuíam mais linfócitos CD8 que os enfermos e, entre os enfermos, aqueles que desenvolveram doença atípica possuíam maior população linfocítica total e subpopulações quando comparados com pacientes que desenvolviam lesão típica (Abraham et al. 1999). Crítica a este trabalho pode ser o fato dos autores trabalharem com doenças causadas por diferentes espécies de parasitos, pois, enquanto os atípicos eram causados por *L chagasi*, os pacientes com lesão típica eram infectados com *L panamensis*. Em outro trabalho na região, comparou-se a produção de citocinas IL-10, IL-12 e INF- γ em pacientes com formas atípicas de leishmaniose cutânea causada por *L. chagasi*, e em pacientes com reação de Montenegro positiva e controles sem história de doença e concluiu-se que pacientes com formas atípicas produzem mais IL-10, que os outros grupos (Rodriguez et al. 2007).

As primeiras descrições de casos atípicos, com manifestações verrucosas e infiltrativas, feitas na região endêmica de Corte de Pedra provêm de trabalho que, entre 1976 e 1982, examinou dados de 182 pacientes e relatou a presença de 8% de pacientes com lesões verrucosas e 4% de pacientes com lesões tipo placas infiltrativas em Três Braços, povoado pertencente à mesma região de Corte de Pedra (Jones et al. 1987). Foi relatado também em Três Braços o caso de uma paciente com múltiplas lesões, inclusive uma lesão em mamilo direito infiltrada, com edema e dor intensa local, além da filha de 03 meses dessa paciente, que desenvolveu lesão no lábio superior, possivelmente por contato direto com a lesão materna, durante a amamentação (Marsden et al. 1985). Este mesmo caso foi revisto, pois a criança, então com quatro anos, desenvolveu lesão em boca, face, seios da face, fossas nasais e pavilhão auricular e mostrou-se não responsiva

ao tratamento habitual (Costa et al. 1988). Na mesma região, foi descrito um caso de lesão cutânea difusa de evolução atípica de um paciente de 16 anos, que desenvolveu lesões nodulares que são típicas desta forma clínica, concomitante à presença de lesões ulceradas. No exame anatomopatológico, as lesões diferiam do que é observado na leishmaniose cutânea difusa, pois o infiltrado era eosinofílico, quando o habitual nesta forma clínica é infiltrado de macrófagos, que se mostram abarrotados de parasitos (Bittencourt et al. 1992). Recentemente um grupo de pacientes de uma região indígena, no Estado de Minas Gerais, foi descrito como portadores de lesões atípicas e com diferenças imunológicas entre pacientes com lesões recentes e lesões tardias (Costa-Silva 2014). Além da forma ulcerada clássica, lesões impetigóides, vegetantes, verrucosas, tumoriformes e lupóide têm sido descritas em pacientes com leishmaniose cutânea.

A despeito da existência de vários relatos de lesões aberrantes, vegetantes, verrucosas, crostosas em pacientes com leishmaniose tegumentar nessa região do país, só existe um estudo sistemático em gestantes. Pacientes gestantes apresentam lesões aberrantes, vegetantes com bordas bem delimitadas. Quando comparadas com mulheres não grávidas portadoras da doença, apresentam lesões de tamanho inicial maior e alcançam maiores dimensões durante o curso da doença. Essas lesões habitualmente reduzem seu tamanho no pós-parto, convertendo-se em lesões semelhantes às não grávidas e respondem de forma semelhante à terapêutica com antimonial, sugerindo que fatores da gravidez influenciam negativamente no curso clínico da doença (Morgan et al. 2007).

A presença de lesão atípica em leishmaniose tegumentar pode em alguns casos guardar relação com o uso prévio de drogas leishmanicidas, como no caso da forma recidiva cutis, que pode surgir após tratamento para LC. Porém na maioria dos relatos os

pacientes não foram tratados previamente, o que exclui a resistência terapêutica como causa de lesões atípicas.

Justificativa

Existe uma substancial variabilidade entre os agentes etiológicos com ao menos 15 espécies descritas (Thomaz-Soccol et al. 1993^{a,b}). A forte associação entre *Leishmania* sp. e forma de doença sugere um papel proeminente do conteúdo genético do microorganismo sobre os desfechos clínicos e terapêuticos das infecções.

Dois trabalhos colombianos (Saravia et al. 1998; Saravia et al. 2002) mostraram-se bastante reveladores ao avaliarem a associação entre o polimorfismo de cepas de *Leishmania* e os desfechos clínicos da doença humana. Em ambos, os autores descreveram uma frequência aumentada de envolvimento mucoso em casos humanos secundários à infecção com determinados zimodemas ou cepas de *L. (V.) braziliensis*. Além do mais, a duração da doença naqueles infectados com parasitos dos zimodemas mais frequentemente envolvidos com LM era estatisticamente mais longa ($p=0,002$) que aquela causada por outras cepas (Saravia et al. 2002).

Recentemente, foi descrito que a de cepas de *L. (V.) braziliensis* circulantes entre casos humanos numa área endêmica para LTA no sudeste do estado da Bahia constitui-se de uma população multiclonal. Neste estudo, também foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre desfecho clínico da LTA e genótipo parasitário (Schriefer et al. 2004). Essas observações indicam que a variabilidade intraespecífica desses microorganismos exerce um papel central na determinação da forma de doença, semelhante ao que ocorre na forte relação entre espécie de *Leishmania* e forma de leishmaniose (Marsden & Jones 1985; Azulay & Azulay 1995).

Reforçando a plausibilidade biológica dos achados epidemiológicos associados com patógenos acima, estudos experimentais têm mostrado que *L. (V.) braziliensis* isolada de pacientes com diferentes formas de doença apresentam comportamentos biológicos distintos *in vitro* e em modelos animais (Kahl et al. 1991; de Oliveira et al. 2004).

Variabilidade nas distribuições geográficas de diferentes formas de LTA tem sido reportada em países andinos. Por exemplo, na LTA pela *L. (V.) braziliensis* no Equador e no Peru, a LM se mostra fortemente restrita à floresta amazônica, ao passo que a LC se distribui amplamente nas terras baixas (Lucas et al. 1998). Essas observações sugerem que espécies e cepas de *Leishmania* se distribuem diferencialmente segundo suas preferências por ecótipos locais, podendo determinar as distribuições das diferentes formas de LTA. Recentemente, mostramos que em Corte de Pedra há uma distribuição significativamente distinta entre casos de LD e LM, que é acompanhada por uma sobreposição com as cepas do parasita que se mostraram associadas a essas formas clínicas em um estudo anterior (Queiroz et al. 2012).

Hipótese:

Diferenças genótípicas entre cepas de *L. (V.) braziliensis* estão relacionadas com os diferentes desfechos clínicos da LTA, dentre eles as apresentações atípicas que têm sido encontradas em Corte de Pedra.

Objetivos:

Objetivo geral:

Avaliar os casos de leishmaniose tegumentar americana em uma área de transmissão de *L. (V.) braziliensis*.

Objetivos específicos

- Descrever clinicamente os casos de leishmaniose tegumentar americana em área endêmica de *L. (V.) braziliensis*.

- Comparar os genótipos dos parasitas obtidos dos casos atípicos com aqueles de *L. (V.) braziliensis* isoladas de casos de LC.
- Comparar as distribuições geográficas entre pacientes atípicos e pacientes de LC diagnosticados no mesmo período.
- Comparar as respostas imunes aos antígenos de *L. (V.) braziliensis* entre pacientes com lesões atípicas e pacientes com LC.

Metodologia

Casuística:

Os pacientes eram recrutados da demanda espontânea do centro de referência e foram selecionados em 02 períodos, (2005 - 2006) e (2008 – 2012). Os critérios de inclusão foram os mesmos nos dois períodos. Foram incluídos pacientes ao serem diagnosticados como portadores de lesão atípica, que foi definida como presença de lesões não usuais (vegetantes, verrucosas, crostosas), que aceitassem participar do estudo e assinassem o Termo de consentimento livre e esclarecido, (Anexo 1). O critério de não inclusão foi a recusa em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Os critérios de exclusão eram a manifesta vontade do paciente de não prosseguir no estudo e o diagnóstico posterior de lesão causada por outra patologia, tais como câncer de pele, esporotricose, hanseníase, etc.

Local do estudo:

O Povoado de Corte de Pedra fica há 260 km ao sul de Salvador (**Figura 1**) e a região é conhecida há mais de 30 anos como área de transmissão de *L. (V.) braziliensis*. O Centro de Referência em Leishmanioses Dr. Jackson Maurício Lopes Costa construído neste distrito, situado no município de Tancredo Neves - Bahia, é um centro de referência para

o atendimento de pessoas com LTA e recebe cerca de 500 a 1.300 pacientes com essa doença anualmente (Jirmanus et al., 2012). Embora nessa área no passado a *L (L.) amazonensis* tenha sido isolada de pequeno número de casos de leishmaniose tegumentar, o agente predominante é a *L (V.) braziliensis* e nos últimos cinco anos somente esta espécie de leishmania foi isolada.



Figura 1 Mapa do Estado da Bahia. Em vermelho Salvador (capital do estado) e em verde a área endêmica de Corte de Pedra.

Investigação Diagnóstica da Leishmaniose

Avaliação clínica: Todos os pacientes foram avaliados clinicamente com observação descritiva do aspecto da lesão de pele. O diagnóstico da leishmaniose foi feito pela presença de uma lesão suspeita e outro critério como: IDRMs positiva, isolamento do parasito em material obtido por aspirado da lesão, aspecto histopatológico de biopsia da borda da lesão ou reação em cadeia de polimerase (PCR) positivo.

Definição de casos:

Leishmaniose cutânea clássica (LC) definida como lesão ulcerada de bordas elevadas, fundo granuloso, em numero inferior a dez lesões.

Leishmaniose mucosa (LM) foi definida como a presença de lesão (ões) em mucosa nasal e/ou orofaríngea com ou sem lesão de pele.

Leishmaniose disseminada (LD) foi considerada a presença de 10 ou mais lesões em áreas não contíguas do corpo, com ou sem a presença de lesão mucosa.

Leishmaniose cutânea atípica (LCA) foi definida pela presença de lesões não usuais (vegetantes, verrucosas, crostosas).

Reação de Montenegro: Foi realizada utilizando-se antígeno de *Leishmania* obtido de cepa de *L. (V.) braziliensis* (IOC L2463, MHOM/BR/2001) como previamente publicado (Reed et al. 1986); 25 µg de antígeno em 0,1 mililitro de solução foi injetada na superfície ventral de antebraço esquerdo e a induração medida no intervalo entre 48 a 72 horas, sendo considerado o teste positivo a induração maior ou igual a cinco milímetros (mm).

Obtenção de material para estudo parasitológico e histopatológico: Após limpeza da lesão com antisséptico e anestesia da borda da lesão com cloridrato de lidocaína a 2%, era feito o aspirado da borda utilizando-se agulha hipodérmica e seringa estéril de 10 ml. O produto era inoculado em meio bifásico LIT / NNN para investigação parasitológica.

A biopsia da borda da lesão foi realizada com “punch” de 4 mm, e dois fragmentos eram obtidos, sendo um acondicionado em tubo plástico com solução de formol a 10% e encaminhado ao Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz da Fundação Oswaldo Cruz, para análise histopatológica. Outro fragmento era acondicionado em tubo plástico contendo RNAlater® solution (Ambion Life Technologies) para extração de DNA para investigação parasitológica através da técnica de PCR .

Investigação parasitológica

O material aspirado foi imediatamente suspenso em meio bifásico LIT / NNN e incubado a 26 ° C durante uma a duas semanas. Em seguida, a suspensão foi transferida para meio de Schneider (Schneider insect extract medium, SIGMA), complementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e 2 mM de L-glutamina, e incubado a 26 ° C durante um período máximo de duas semanas. A determinação das espécies de *Leishmania* isoladas foi realizada por qPCR em tempo real (Weirather et al. 2011). Os parasitas foram congelados em DMSO a 10%, meio de crescimento a 90%, em nitrogênio líquido e descongelados antes dos ensaios de genotipagem.

Clonagem de fragmentos de DNA Genômico de *L. (V) braziliensis* amplificados por PCR

A seleção dos alvos genômicos de *L. (V.) braziliensis* usados nas genotipagens foi baseada em várias bandas geradas por RAPD, que tinham sido úteis para subtipagem isolados de *L. (V.) braziliensis* de Corte de Pedra em estudo anterior (figura2) (Schriefer et al., 2004). Esses *loci* foram novamente amplificados por RAPD de cada um de nove isolados de *L. (V.) braziliensis*, utilizando os iniciadores e protocolos anteriormente descritos. As bandas de DNA resultantes foram clonadas no vetor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Inc.) de acordo com as instruções do fabricante. Plasmídeos foram

preparados a partir de quatro clones de bactérias representativos de cada reação de transformação. Em seguida, os insertos desses plasmídeos foram sequenciados. Após o alinhamento das sequências homólogas, seis *loci* polimórficos (CHR 24/3074, CHR 26/765, CHR 28/ 195696, CHR 28/425451, CHR 32/1356278, CHR 35/335652) foram identificados. Os *loci* CHR24/3074 e CHR28/425451 foram utilizados neste estudo.

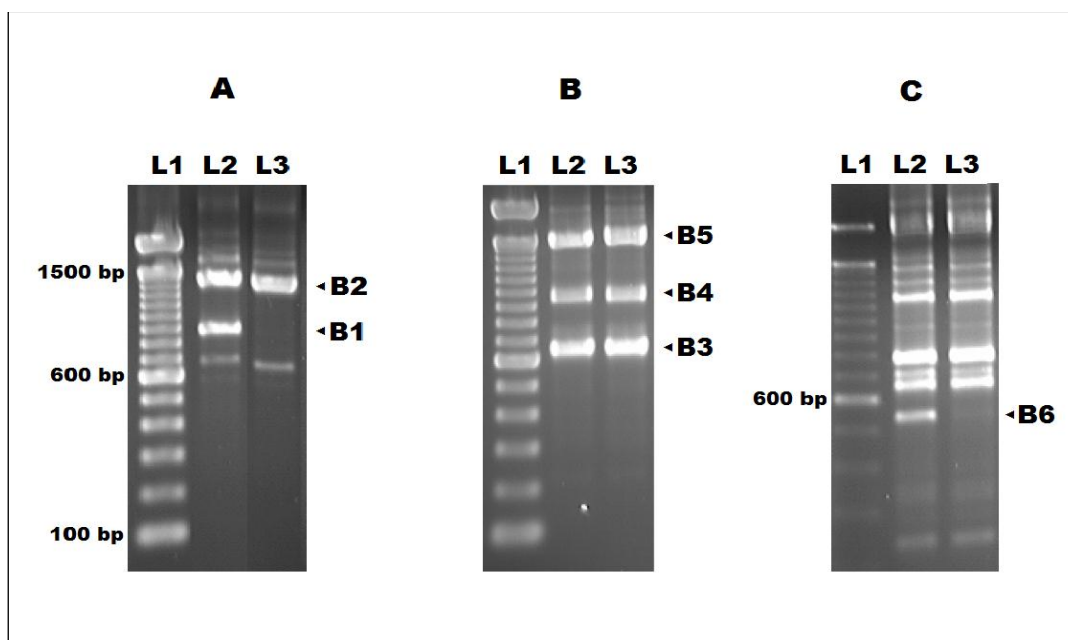


Figura 2. Padrões eletroforéticos de amplicons gerados a partir do DNA genômico de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, gerados por protocolos de RAPD previamente publicados (separadamente representados nos painéis A, B e C) (30). As bandas marcadas foram excisadas, clonadas e sequenciadas, e depois alinhadas, entre nove isolados de *L. (V.) braziliensis* de Corte de Pedra, para a detecção de polimorfismos. Os *loci* polimórficos seguintes foram detectados entre os parasitas de Corte de Pedra: (B1) CHR 24/3074 (cromossoma 24, com início na posição 3074), (B2) CHR 26/765, (B3) CHR 28/195696, (B4) CHR 28/425451, (B5) CHR 32/1356278 e (B6) CHR 35/335652. O *locus* CHR 26/765 foi também encontrado no cromossomo 33, a partir de posição 1476284. (L1) marcador de peso molecular. (L2, L3) Exemplos de isolados de *L. (V.) braziliensis*. (pb) de comprimento dos ácidos nucleicos estimados em pares de bases.

Com base nas sequências geradas com os ensaios preliminares acima, um par de iniciadores foi concebido e utilizado para amplificar o *locus* selecionado (CHR28/425451) com 621 pares de base, que se encontra no cromossomo 28 na posição 425451–426067 por PCR, empregando temperatura de anelamento de 58° Celsius e MgCl₂ na concentração de 1 mM, a partir de isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos dos pacientes com LC e LCA recrutados. Nessas reações, 3 ng de DNA genômico foram incubadas com 1 pmol de cada primer direto e reverso. As seguintes condições de

amplificação foram empregadas: 5 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min à temperatura de anelamento 58°C, e 2 min à 72°C, seguido por uma extensão final a 72°C durante 10 min.

Os amplicons foram submetidos à eletroforese e as bandas correspondentes foram extraídas a partir de géis de agarose e clonadas em vetor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Inc.). Os plasmídeos contendo cada um dos quatro fragmentos amplificados, a partir de cada um dos isolados de *L. (V.) braziliensis*, foram transformados em *Escherichia coli* DH5 α competente. Mini-preparações de plasmídeo foram obtidos a partir de quatro clones bacterianos por locus representativo avaliado.

Para a análise das sequências de ácidos nucleicos dos loci polimórficos, os insertos nos plasmídeos foram sequenciados, empregando-se um iniciador complementar para a sequência do bacteriófago M13 presente no vetor. Os sequenciamentos foram realizados na Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul). As sequências foram comparadas empregando-se o pacote de software (Mega 5.2). Primeiro determinou-se a sequência consenso em todos os loci, comparando-se os loci homólogos nos diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis*. Então, as sequências de cada um dos quatro loci foram analisadas para a identificação da ocorrência de SNPs (single nucleotide polymorphism) e / ou indels (inserções ou deleções) entre os vários segmentos homólogos de DNA genômico parasitário e as posições desses polimorfismos anotadas. Por exemplo, se um determinado isolado tem citosina (C) na posição 30, timina (T) na posição 286 e adenina (A) na posição 418, ele é classificado como CTA. Uma vez alinhados e identificados os pontos polimórficos, o resultado é exportado para uma planilha Microsoft Excel 2010, onde a quantidade de polimorfismos é quantificada. Para comparação quanto a número de polimorfismos foram escolhidos alatóriamente isolados controles de pacientes com LC que já haviam sido sequenciados em trabalho prévio (Queiroz et al. 2012), na proporção

de dois controles para cada LCA. Utilizamos o teste exato de Fisher para comparar a quantidade de polimorfismo em cada grupo LC x LCA.

Distribuição Geográfica dos Casos de LTA em Corte de Pedra – BA

A distribuição de casos de LTA em Corte de Pedra foi determinada pela aquisição das coordenadas geográficas por GPS das residências dos pacientes diagnosticados com LCA e LC, prováveis locais de transmissão da doença. As coordenadas geográficas foram obtidas utilizando um aparelho Garmin GSX 60 (Garmin, Riverton, WY, EUA), que tem uma precisão de 03 m. O datum utilizado foi o WGS 84. As residências dos pacientes foram utilizadas como pontos de referência para fins de padronização. As coordenadas obtidas foram plotadas, para a inspeção visual, em uma fotografia de satélite com alta definição da região de Corte de Pedra (ENGESAT, Curitiba, Brasil), utilizando-se o sistema de informação geográfica (SIG) ArcGis versão 10 (Environmental Systems Research Institute Inc., Redlands, CA, EUA). Para avaliação da distribuição geográfica, as coordenadas obtidas foram comparadas com as coordenadas de pacientes com LC, selecionados aleatoriamente, obtidas em estudo prévio (Queiroz et al. 2012). Utilizamos o teste de caso controle espacial de Cusick e Edward, do pacote estatístico Clusterseer 2.5 (Biomedware).

Tratamento: Todos os pacientes foram tratados com antimonial pentavalente (Glucantime®) com dose de 20mg/Kg/dia durante 20 a 30 dias. No caso de falha ao antimonial por duas ou mais vezes consecutivas, pacientes foram tratados com a associação de Glucantime® e Pentoxilifilina (400mg, 03 vezes ao dia, durante 20 dias) ou Anfotericina B (0,5 mg/Kg de peso, 03x por semana, até a dose total de 1,0g a 1,5g). No caso das gestantes, optou-se pelo tratamento pós-parto, exceto nos casos mais graves nos quais o antimonial foi prescrito no terceiro trimestre de gestação. O Ministério da

Saúde reconhece como falha ao antimônio a persistência de lesão ativa após o uso de 2 cursos completos da droga (Ministério da Saúde 2007).

Avaliação imunológica: sangue heparinizado (30 ml) obtido de veia periférica foi utilizado para a separação de células mononucleares (CMSP) através de centrifugação em gradiente de densidade usando meio de separação de linfócitos Ficoll-Hypaque (Organon Teknika, Durham, N.C.). Após lavagem em solução salina, as células foram ressuspensas em RPMI 1640 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de soro AB, penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (100µg/ml). Alíquotas de 0,1ml, contendo 3×10^6 células foram incubadas em placas de 24 orifícios e mantidas sem estímulos ou estimuladas com antígeno solúvel de leishmania na concentração de 05µg/poço. Após incubação por 48 horas a 37 °C, em ambiente com 5% de CO₂, o sobrenadante foi colhido e armazenado a -70° C. As determinações de níveis de INF-γ (BD Bioscience) e TNF-α (R&D Systems, Minn., MN) foram realizadas através da técnica de Elisa “sandwich”. Para comparação da resposta imune foram utilizados dados de pacientes selecionados aleatoriamente de estudo imunológico realizado em paralelo (Novoa et al. 2011).

Avaliação laboratorial adicional

Os pacientes com lesões atípicas foram também avaliados por testes sorológicos quanto à presença de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus B da hepatite, vírus C da hepatite e vírus linfotrófico de células T humanas (HTLV-1). Foi também realizada a determinação da glicemia capilar, sendo considerados portadores de diabetes mellitus aqueles com níveis acima de 100mg/dl em jejum e acima de 200mg/dl para os pacientes que se alimentaram no período de 12 horas antes do exame. Avaliação da função renal e enzimas hepáticas foram mensuradas e foi realizado eletrocardiograma (ECG). Esses pacientes foram questionados quanto ao uso de drogas imunossupressoras,

doenças concomitantes e pregressas. Para a identificação de gestantes entre as mulheres recrutadas, foi realizada a dosagem de β -HGC. Todas as gestantes foram encaminhadas ao programa de acompanhamento pré-natal de seus municípios de origem. Pacientes que se mostraram positivos para HIV ao teste sorológico (Elisa) foram avaliados quanto à contagem de células CD₄ (Multi trucount test) e carga viral (NASBA).

Resultados:

O total de pacientes atendidos nos dois períodos de estudo foi de 5742, sendo 69 considerados como portadores de lesões atípicas, o que corresponde a 1,2% dos casos. Dos 69 pacientes, 16 (23,2%) eram gestantes e 02 (2,9%) apresentavam síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Destes 69 pacientes, a presença de lesões vegetantes foi documentada em 25 (36,2%), seguido de lesões ulcero-vegetante que ocorreu em 19 (27,5%) pacientes e lesões crostosas que foi verificado em 16 (23,2%) pacientes. Foi diagnosticado também pacientes com lesões verrucosas (4/5,8%), lupóide (2/2,9%), esporotricóide (2/2,9%) e zoosteriforme (1/1,4%). Os dados clínicos dos pacientes que fizeram parte de deste estudo estão sumarizados na tabela 1 e comparados com um grupo de pacientes com LC randomicamente selecionados. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação a idade e o tempo de lesão, e apesar de não ser estatisticamente significativa, há uma tendência a predomínio do gênero masculino. Os grupos diferem principalmente quanto à presença de lesões acima da cintura, presença de lesões em segmento cefálico e resposta ao antimonial.

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes com LCA comparados com pacientes com LC.

	Atípicos totais	Sem fatores de risco aparentes	Gestantes	AIDS	LC	P
N	69	51	16	2	27	
Idade: média ±DP	29,2 ± 13,5	30,6± 14,4	23,4± 6,9	41±22,6	29,1±12,8	0,157 ^a
Gênero Masculino (%)	40 (57,9)	38 (74,5)	-	2 (100)	21(77,7)	0.07 ^b
Tempo de lesão: média ±DP (dias)	128 ± 289	128 ± 330	75,1±68,2	317±67,2	40,9±19,7	0.227 ^a
IDRM positivo: (%)	59 (85,5)	40 (78,4)	15 (94,1)	2 (100)	27 (100)	0.04 ^b
Num de lesões: mediana ± DP	2 ± 120,3	2 ± 160	2 ± 3,4	8± 9,9	1±0,6	
Lesão acima da linha cintura	44 (63,7)	43 (84,3)	9 (56,2)	1 (50)	9(33,3)	0.0001 ^b
Lesões em segmento cefálico	31 (44,9)	26 (51)	4 (23,5)	1 (50)	1(3,7)	0,0002 ^b
Falha ao 1º ciclo de antimonial	47 (68,1)	39 (76,4)	5 (31,2)	2 (100)	9 (33,3)	0.0001 ^b
Falha ao antimonial ^c	38 (55)	33 (64,7)	2 (12,5)	2(100)	0	0.0001 ^b

a= ANOVA

b = Chi-quadrado (o grupo de pacientes com AIDS foram excluídos da análise).

c = falha a dois ciclos regulares de antimonial

Distribuição geográfica

No tocante à distribuição geográfica, 49 pacientes com LCA sem fatores de risco aparente foram comparados com um grupo de pacientes com LC que foram randomicamente recrutados. As duas formas clinicas estão igualmente distribuidas por toda a área endêmica P=0,258 (teste de Cusick e Edward). A imagem de satélite com os pontos plotados correspondentes a cada caso estudado pode ser vista na figura 3, sendo que alguns pontos aparecem, inclusive, sobrepostos na imagem, devido à baixa resolução da foto (30 metros). Nota-se na imagem a ausência de casos de LC quadrante infero-esquerdo, o que é ocasionado por um ambulatório que absorve parte casos de LC,

porém drena para o centro de referência de Corte de Pedra, os casos mais complexos como LCA, LM e LD.

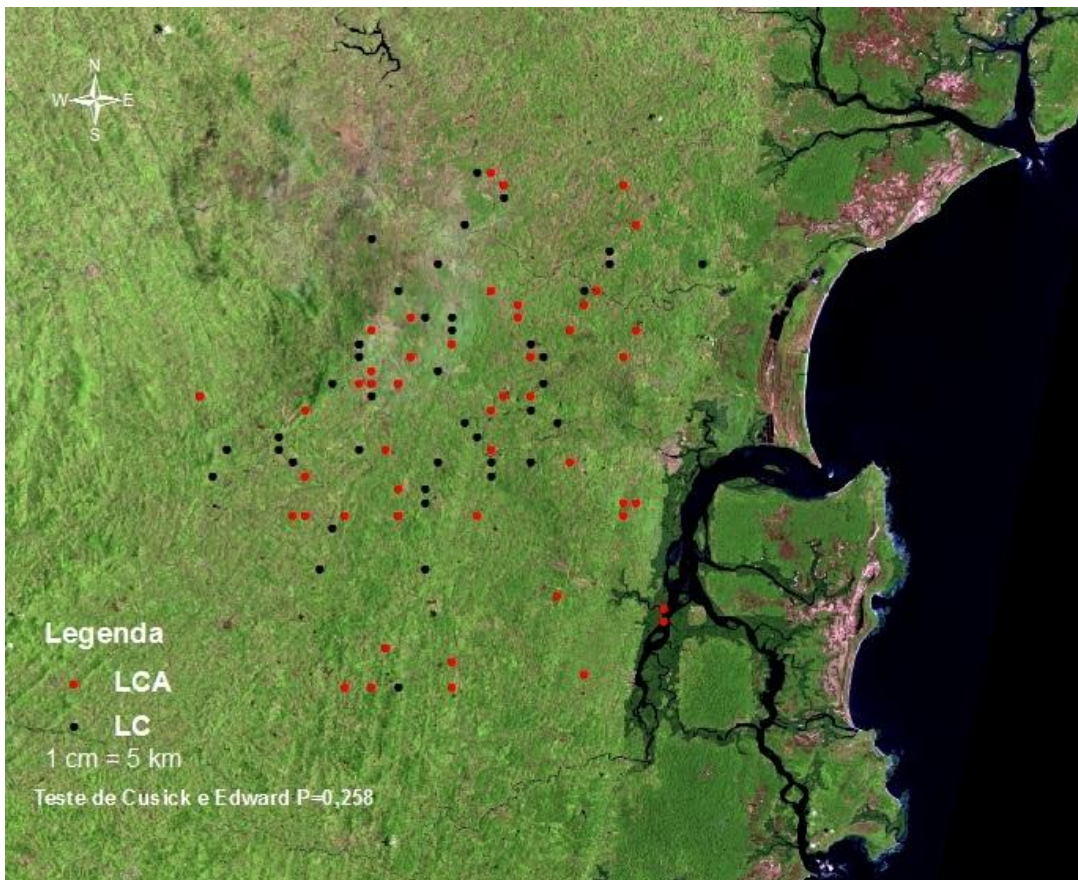


Figura 3. Foto de satélite da região de Corte de Pedra mostrando a distribuição de pacientes com leishmaniose cutânea atípica (LCA) e leishmaniose cutânea.

Investigação parasitológica

Foram obtidos isolados de 23 pacientes com LCA e 56 pacientes com LC, que geraram respectivamente 56 e 202 clones. O *locus* estudado apresentava SNPs nas posições 30, 286 e 418, posições estas que já se mostravam polimórficas em estudo prévio (Queiroz et al 2012) que analisados em conjunto produziram os seguintes haplótipos: CCC, TTC, TCC, TTA e CCA. O resultado da análise da frequência de cada haplótipo em cada forma de apresentação da doença pode ser visto na **tabela 2**.

Tabela 2. Comparação dos haplotipos estudados no locus CHR28/425451 e LC X LCA (3 SNPs posições 30, 286 e 418)

Haplótipo	LC	LCA	P*	Odds ratio	CI
CCC	85	32	0,05	1,835	1,009 – 3,339
TTC	48	23	0,02	2,236	1,199 – 4,171
TCC	0	1	0,21		
TTA	41	0	0,0001	0,03	0,002 – 0,57
CCA	28	0	0,001	0,05	0,003 – 0,9

* Teste exato de Fisher CI= intervalo de confiança

Reforçando esses dados acima, pacientes com LCA houve ainda dois polimorfismos do tipo SNP nas posições 254 e 321 que não foram observadas em nenhum isolado de LC até o momento. E ao acrescentar estas posições nas análises, obtivemos os seguintes haplotipos: CACAC, TATAC, CCCCA, TCTCA, TCTAC, CCCAC, TCCAC, CCCCC, TCTCC e a comparação da frequência desses haplotipos entre pacientes com lesões atípicas e pacientes com LC pode ser visto na tabela 3.

Tabela 3. Comparação das frequências dos alelos do locus CHR28/425451 entre L (V.) braziliensis isolados de LC X LCA (5 SNPs posições 30,254, 286, 321 e 418).

Haplótipo	LCA	LC	P*	Odds ratio	CI
CACAC (%)	7 (16,7)	0	0,0008	28,9	1,6 – 521,8
TATAC (%)	4 (9,5)	0	0,019	16	0,839 – 305,6
CCCCA (%)	0	12 (17,6)	0,003	0,05	0,003 – 0,92
TCTCA (%)	0	13 (19,1)	0,001	0,04	0,002 – 0,83
TCTAC (%)	1 (2,4)	0	0,38	4,95	0,197 – 124,5
CCCAC (%)	2 (4,8)	0	0,14	8,457	0,39 – 180,7
TCCAC (%)	1 (2,4)	0	0,38	4,95	0,197 – 124,5
CCCCC (%)	14 (33,3)	26 (38,2)	0,68	0,8	0,36 – 1,81
TCTCC (%)	13 (30,9)	17 (25)	0,51	1,34	0,57 – 3,16

* Teste exato de Fisher CI= intervalo de confiança.

Depois dessa análise notamos que as posições 321 e 418 discriminavam bem os parasitos isolados de pacientes com lesões atípicas e isolados de pacientes com LC. Estas duas posições polimórficas geraram três haplótipos diferentes, CA, AC e CC, cuja comparação de frequência nos isolados estudados pode ser vistos na tabela 4.

Tabela 4. Comparação das frequências dos alelos do locus CHR28/425451 entre *L. (V.) braziliensis* isolados de LC X LCA (2 SNPs, posições 321 e 418)

Haplótipo	LCA	LC	P	Odds ratio	CI
CA	0	16	0,0006	0,03	0,002 – 0,69
AC	14	0	< 0,0001	158,6	8,6 – 2922
CC	19	30	0,79	1,27	0,45 – 3,53

* Teste exato de Fisher CI= intervalo de confiança.

Resposta Imune

A avaliação da resposta imune em cultura de células mononucleares de sangue periférico foi realizada em 17 pacientes com LCA sem fatores de risco e comparados com 27 pacientes que apresentavam LC. As características clínicas dos dois grupos estão sumarizadas na **tabela 5**.

Não houve diferença com relação à idade e sexo entre os dois grupos. A duração de doença foi mais prolongada nos pacientes com forma atípica com $P = 0.05$. A proporção de lesões acima da cintura pélvica e em face foi maior nos casos atípicos do que nos pacientes com LC. A resposta terapêutica ao primeiro ciclo de antimonial foi observada em 41,2% dos casos atípicos em 65,4% nos pacientes com doença clássica. Porém quando observados os critérios de falha ao antimonial usado pelo Ministério da Saúde, sete pacientes falharam e necessitaram de droga de segunda escolha no grupo com LCA,

enquanto no grupo com LC, nenhum paciente necessitou de droga de resgate (P=0,0006).

Tabela 5. Comparação de dados clínicos entre pacientes com lesões atípicas sem fatores de risco e lesões cutâneas clássicas que foram comparados imunologicamente.

Variável	Atípicos	LC clássica	P
N	17	27	
Gênero (masc/fem)	2.4/1	4.4/1	0.4727 ^a
Idade média ± DP (anos)	31.4±13.8	29±12.8	0.5599 ^b
Forma cutânea	17 (100)	27 (100)	-
Tempo de lesão média ±DP (dias)	137±253.8	41±19.6	0.0555 ^b
IDRM média ±DP (mm)	15±4.2	17.2±5.3	0.1553 ^b
Lesão acima da cintura n(%)	16(94,1)	9(33,3)	0.0001 ^a
Lesão em seg. cefálico n(%)	8(47)	1(3,8)	0.0010 ^a
Resposta ao antimonial ^c n(%)	7(41,2)	17(65,4)	0.2086 ^a
Falha ao antimonial n(%)	7 (41,2)	0	0,0006 ^a

a = Teste exato de Fisher

b = Teste t de Student

c = cicatrização com um ciclo de antimonial

A produção de IFN- γ , foi significativamente maior (p=0,0002) no grupo de pacientes com lesões clássicas (média ± DP 4445,9pg/ml ± 4853,1) quando comparados com pacientes com lesões atípicas (média ± DP 747,1 pg/ml ± 535,7) (**Gráfico 1**). A produção de TNF- α também foi significativamente maior (p<0,0001) no grupo de pacientes com lesões clássicas (média ± DP 1906,1 pg/ml ± 1624,6) quando comparados com o grupo de pacientes com lesões atípicas (média ± DP 316,5 pg/ml ± 256,2) (**Gráfico 2**). Os dados obtidos em relação a IL-10 demonstram justamente o contrário, com uma produção significativamente maior (p=0,0006) por parte dos pacientes com lesões atípicas (média ± DP 392,8 pg/ml ± 223,5) quando comparados com pacientes com lesões clássicas (média ± DP 171,9 pg/ml ± 234,4) (**Gráfico 3**). A produção de IL-17 também foi significativamente maior (p=0,0008) nos pacientes com lesões atípicas

(média \pm DP 218,4 pg/ml \pm 229,9) quando comparados com LC (média \pm DP 69,4 pg/ml \pm 135) (Gráfico 4).

Gráfico 1 Comparação da produção antígeno específica, por células mononucleares de sangue periférico, estimuladas com antígeno solúvel de Leishmania, de IFN- γ entre pacientes com LCA e pacientes LC.

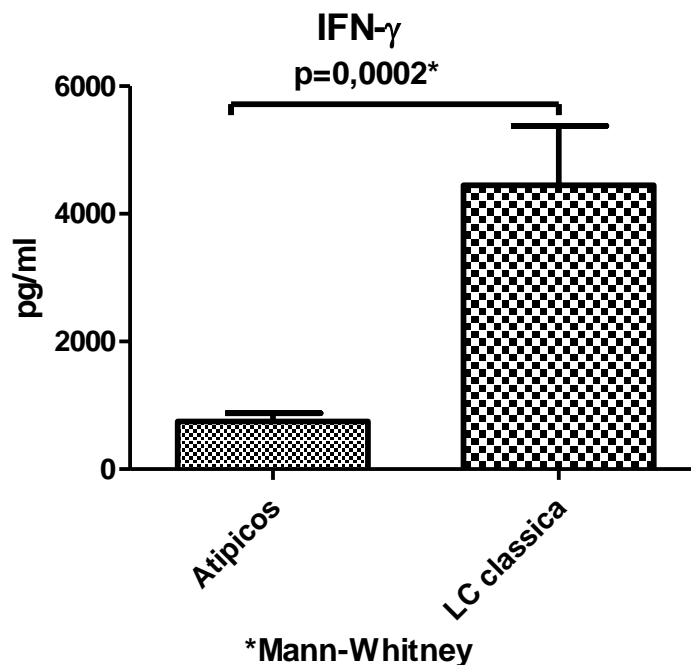


Gráfico 2 Comparação da produção antígeno específica, por células mononucleares de sangue periférico, estimuladas com antígeno solúvel de Leishmania, de TNF- α entre pacientes com lesões atípicas e pacientes com lesões clássicas.

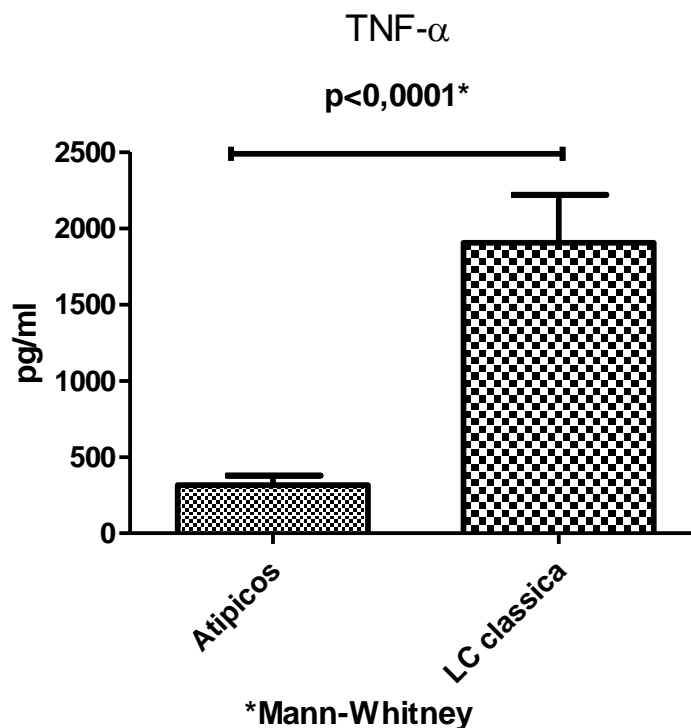


Gráfico 3 Comparação da produção antígeno específica, por células mononucleares de sangue periférico, estimuladas com antígeno solúvel de Leishmania, de IL-10 entre pacientes com lesões atípicas e pacientes com lesões clássicas.

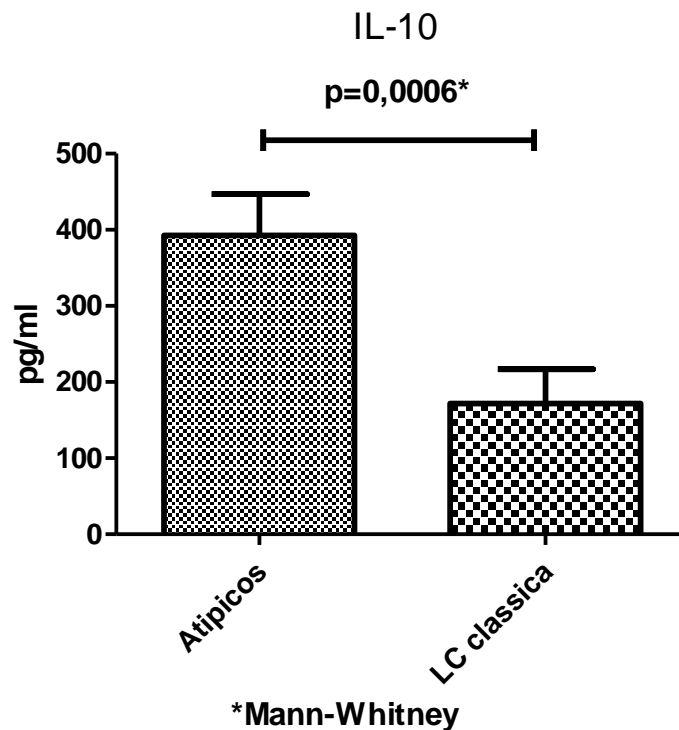
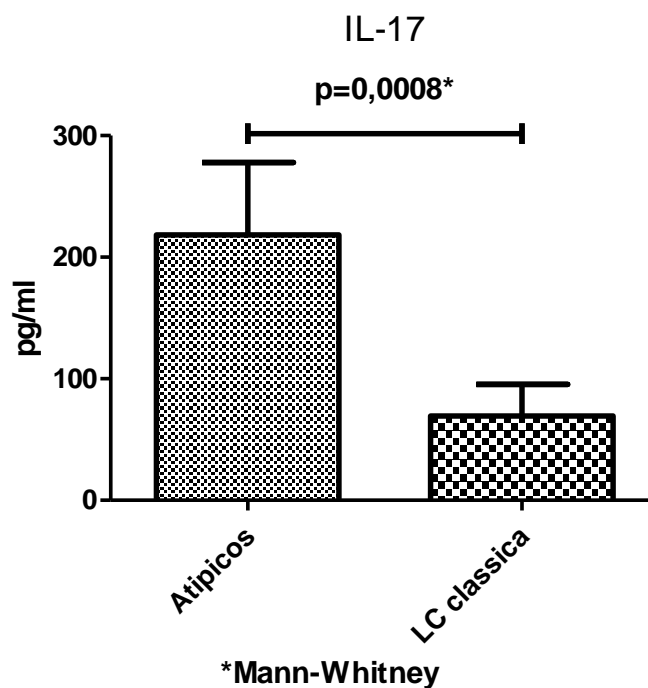


Gráfico 4 Comparação da produção antígeno específica, por células mononucleares de sangue periférico, estimuladas com antígeno solúvel de Leishmania, de IL-17 entre pacientes com lesões atípicas e pacientes com lesões clássicas.



Pacientes gestantes

Quanto as 16 pacientes gestantes, 13 pacientes (81,2%), apresentavam 03 ou menos lesões, embora uma paciente tenha apresentado 15 lesões situadas em diversos segmentos do corpo, caracterizando a forma disseminada da doença, inclusive com envolvimento de mucosa nasal. As lesões foram predominantemente em membros inferiores e posteriormente em membros superiores, havendo 4 casos de lesões em face ou região cervical. Uma das características deste grupo foi a presença de lesões exofíticas, grandes, exuberantes e com bordas bem definidas. Exemplo de lesões em gestante pode ser vistas nas figuras 4a e 4b.



Figura 4a. Gestante, 19 anos, biopsia compatível com LTA, IDRМ positivo, lesão vegetante, bem delimitada em nádega direita.



Figura 4b. Paciente gestante 22 anos, IDRМ 30x29mm, cultura positiva, lesão vegetante associada a lesões satélites em coxa esquerda.

Na quase totalidade (15/16) das pacientes gestantes, o teste de hipersensibilidade tardia (IDRM) foi reator (≥ 5 mm). Parasitos foram isolados de 7 pacientes e em todos os casos o agente causal foi *Leishmania braziliensis*. É preconizado pelo ministério da Saúde que o uso de antimonial seja feito após o parto ou, nos casos graves no terceiro trimestre de gravidez. Na maioria das pacientes (13 casos), a opção foi o tratamento pós-parto e essas pacientes tiveram boa resposta com um (1) ciclo de antimonial, havendo dentre as 16 pacientes apenas dois casos (12,5%) de falha terapêutica.

Dentre as 3 (21%) pacientes que receberam antimonial no terceiro trimestre de gestação, por apresentarem lesões graves e progressivas, nenhum caso cicatrizou antes do parto, e não houve relatos de efeitos deletérios sobre a gestação e o feto. Foi interessante observar que essas pacientes apresentaram mudanças na apresentação da doença no pós-parto, pois as lesões rapidamente se converteram em lesões clássicas. Todas as pacientes foram orientadas a seguirem seus exames pré-natais. Uma paciente teve abortamento espontâneo, antes do tratamento com antimonial. Destas 16 pacientes, 14 foram descritas em trabalho publicado previamente (Morgan et al.2007).

Pacientes portadores da AIDS

Dos pacientes com coinfeção HIV/leishmaniose que apresentavam lesões atípicas, o primeiro identificado tinha 57 anos na época do diagnóstico, masculino, também apresentava sorologia positiva para vírus B da hepatite e doença de Chagas. Inicialmente, havia duas lesões infiltradas e exofíticas em face posterior de coxa esquerda, que no decorrer da doença coalesceram, formando lesão única que tomava grande parte da face posterior e medial da coxa esquerda. A biopsia da borda da lesão mostrou intenso infiltrado inflamatório constituído por linfócitos epitelióides e células gigantes multinucleadas, com formação de granulomas e estruturas compatíveis com amastigotas de *Leishmania sp* no interior de alguns macrófagos vacuolizados. Esse

paciente, no momento do diagnóstico da infecção pelo HIV, apresentava contagem de linfócitos CD₄ de 74 cels/mm³, mas o teste de Montenegro foi positivo. Foi tratado com seis ciclos de antimonial com melhora parcial da úlcera, porém sem cicatrização completa da lesão. Após um curso de anfotericina lipossomal, associado com terapia antirretroviral, houve cicatrização da lesão. Faleceu em 2011 devido a complicações cardíacas da doença de Chagas.

O segundo paciente tinha 25 anos na época do diagnóstico, masculino, além da infecção pelo HIV, documentada por sorologia e confirmada por exame de carga viral e contagem de linfócitos CD₄ (154cels/mm³), também apresentou sorologia positiva para o vírus C da hepatite. As lesões de leishmaniose neste paciente eram infiltradas (face), ulcero-vegetantes em MMII (**Figuras 5a e 5b**) e diversas lesões acneiformes e ulceradas distribuídas por todo corpo, além de apresentar envolvimento da mucosa nasal e orofaríngea. O exame histopatológico da biopsia de pele mostrou na derme presença de infiltrado mononuclear com numerosos macrófagos epitelióides e espumosos contendo no seu interior corpúsculos compatíveis com *Leishmania sp.* Na cultura do aspirado da lesão foi isolado *Leishmania spp.* Este paciente utilizou três ciclos de antimonial sem melhora significativa. Após terapia com antirretroviral e anfotericina B, evoluiu com cicatrização das lesões e até o momento da última avaliação clínica (novembro/2008), não apresentava reativação da doença.



Figura 5a e 5b Paciente, 25 anos, masculino, HIV+, vírus C+, IDRM +, cultura positiva para *Leishmania* sp biopsia compatível. Lesões infiltrativas em tornozelo esquerdo (seta) e exulceração em pé esquerdo. Lesão infiltrativa em nariz com comprometimento de mucosa nasal, e lesões acneiformes em região mentoniana e labial.

Discussão

A forma atípica de LTA vem chamando atenção há tempo, sendo o primeiro relato em revista indexada data de 1950 (Cordero 1950), e desde então vem sendo eventualmente relatada em casos esporádicos, com poucos estudos sistemáticos. Geralmente, as causas dessas formas atípicas são aventadas pelos autores como alguma condição clínica do paciente, tal como AIDS (Da-Cruz et al. 1999), DM (Lopes et al. 2013), uso de drogas imunossupressoras (Saha et al. 2006) e desnutrição (Castro et al. 2008). Há ainda a possibilidade de fatores ambientais contribuírem para essas manifestações (Convit et al. 2006). Mais recentemente com o desenvolvimento de novas ferramentas de estudo parasitológico e imunológico, atenção maior tem sido dada a interação parasita – hospedeiro. A variabilidade genética humana e as diversas espécies de *Leishmania* distribuídas pelo mundo produzem uma miríade de combinações que podem justificar a presença de lesões atípicas.

A presença de manifestação atípica de uma doença sempre suscita discussões e dúvidas na área de saúde, tanto pela dificuldade diagnóstica, pois a forma não usual de apresentação pode levar o profissional de saúde a trilhar uma linha diagnóstica errônea, quanto pelo aspecto terapêutico, pois com o diagnóstico por vezes retardado, encontramos uma doença geralmente mais avançada. A LTA é por se só uma doença que apresenta certos desafios diagnósticos, pois ainda não dispomos de um teste diagnóstico que reúna as características ideais de aplicabilidade, pois, que deve ser simples para aplicação na rotina, barato, dado o número de pessoas sob risco e com alta sensibilidade e especificidade.

No caso específico da região endêmica de Corte de Pedra, onde apenas um parasito é determinante de pelo menos três formas clínicas bem reconhecidas, torna-se imperioso estudar melhor a relação parasita – hospedeiro. Os pacientes com LCA tiveram uma taxa de falha ao antimonial com elevada significância quando comparados com LC, o que implica em mais uma dificuldade no manejo desses pacientes.

O grupo de pacientes gestantes apresentam características próprias e já foram descritas (Morgan et al. 2007). Estas pacientes que manifestam a doença durante a gestação apresentam lesões exuberantes, vegetantes e que são inicialmente maiores que mulheres não grávidas. Curiosamente, estas pacientes têm suas mudadas de aspecto no pós-parto, com tendência a converter-se em lesões clássicas e com boa resposta ao antimonial. Este fato sugere que a gestação tem influência sobre a forma de apresentação da leishmaniose cutânea.

Os pacientes portadores da AIDS apresentavam um quadro clínico grave quando da apresentação da doença, pois com baixa população de linfócitos CD4, estavam sob o risco de desenvolvimento de doenças oportunistas, além de apresentarem outras comorbidades como doença de Chagas e hepatites virais. Os dois pacientes foram

tratados com anfotericina B, e só cicatrizaram quando tratados com terapia antirretroviral e elevaram os níveis de CD4, demonstrando que o déficit imunológico é a causa das lesões atípicas nestes casos.

O fato destes pacientes terem tempo de doença diferente daqueles com LC ilustra a maior dificuldade de diagnóstico destes pacientes e este fato pode ter impacto na resposta imune que, de fato, é diferente entre os grupos. A resposta imune na leishmaniose tegumentar causada pela *L. (V.) braziliensis* se caracteriza por uma exagerada resposta TH1 com produção elevada de IFN- γ e TNF- α e baixa produção de IL-10 (Bacellar et al. 2002). É verdade que na fase inicial da infecção quando a úlcera ainda não está formada, concentrações baixas de IFN- γ são documentadas e uma elevação da produção desta citocina ocorre *in vitro* após a neutralização da IL-10 com anticorpo monoclonal contra esta citocina (Rocha et al. 1999). Esta transitória baixa produção de IFN- γ é rapidamente restaurada e úlcera cutânea está associada tanto com uma exacerbada e não apropriadamente modulada resposta de células CD4+ como com ativação de células CD8+ (Gaze et al. 2006; Faria et al. 2009; Santos et al. 2013). Como o IFN- γ tem um papel importante na defesa contra agentes intracelulares através da ativação de macrófagos o dano tecidual causado pela resposta imune tem sido predominantemente associado ao TNF- α e a ativação de células citotóxicas (Brodskyn et al. 1996; Faria et al. 2005, de Oliveira & Brodskyn 2012; Novais et al. 2014).

A importância do IFN- γ como mecanismo de defesa na leishmaniose tegumentar tem sido bem documentada. Ausência ou baixa produção de IFN- γ se associa com disseminação de *L. infantum* e *L. donovani* levando a um quadro de leishmaniose visceral (Wilson et al. 2005). Baixa ou ausência de produção IFN- γ é também observada em pacientes infectados com *L. amazonensis* e que desenvolvem leishmaniose difusa (Barral et al. 1995). A leishmaniose cutânea difusa tem características clínicas bem

definidas e distintas do que é observado na leishmaniose cutânea clássica e também em pacientes com formas atípicas da doença. Tanto na leishmaniose visceral como na leishmaniose difusa a baixa produção de IFN- γ é mediada pela IL10 desde que a neutralização in vitro da IL-10 restaura a produção de IFN- γ . No presente estudo, a maioria dos pacientes com leishmaniose atípica produziram IFN- γ , mas esta produção foi inferior ao observado em pacientes com a doença clássica, enquanto a produção de IL-10 foi maior nos pacientes com a forma atípica da doença. Desta forma, é possível que a produção mais elevada da IL-10 contribua para o aparecimento de lesões atípicas na doença causada pela *L.(V.) braziliensis*.

Anteriormente, nós já mostramos que clinicamente estes pacientes com formas atípicas diferem clinicamente de pacientes que apresentam a leishmaniose cutânea disseminada. Nesta forma da doença a produção de IFN- γ é também inferior aos pacientes com leishmaniose cutânea (Turetz et al. 2002 e Leopoldo et al. 2007). Todavia a baixa produção de IFN- γ por células do sangue periférico está relacionada com o desvio da maioria das células T antígeno reativas estarem nas centenas de lesões apresentadas por pacientes com a forma disseminada (Machado et al. 2011). Ou seja, do ponto de vista imunopatológico, as lesões cutâneas da forma disseminada se assemelham com o observado na doença clássica com infiltração linfocitária e ausência ou escassez de parasitos (Machado et al.2011). A citocina IL-17 tem papel ainda não completamente elucidado na patogênese da leishmaniose. Foi demonstrado que a produção de IL-17 é regulada negativamente por IFN- γ (Park et al. 2005). Estudo prévio realizado com pacientes portadores de LC e LM da região de Corte de Pedra mostrou que existe uma correlação direta entre o numero de células produzindo IL-17 na lesão e a inflamação tecidual (Bacellar et al. 2009). Portanto, nos pacientes portadores de LCA, existe tanto

uma produção menor de IFN- γ , necessário para conter o parasito, como também uma produção maior IL-17, que pode estar relacionada com a maior inflamação tecidual.

A diversidade genética dos parasitos já está bem documentada e no caso da *L. (V.) braziliensis*, já há trabalhos mostrando que essas diferenças genéticas estão relacionadas com apresentação clínica da doença (Schriefer et al. 2004; Queiroz et al. 2012). A diferença genotípica dos isolados de pacientes com LCA e com LC mostradas neste trabalho identificam que os parasitos circulantes em Corte de Pedra, são polimórficos fato que pode estar relacionado com o curso clínico da doença. Os isolados de pacientes com LCA apresentaram cinco polimorfismos do tipo SNP em um *locus* com 621 pares de base, demonstrando que esses isolados são ao menos na pequena área do genoma estudada, são mais polimórficos quando comparados com isolados de LC. As diferenças genéticas encontradas entre os parasitos podem ser marcadores de cepas mais propensas ao desenvolvimento de lesões atípicas em pacientes da região de Corte de Pedra. O uso de ferramentas moleculares pode servir de base para uma decisão terapêutica mais individualizada no futuro. Observou-se uma clara desproporção nas frequências dos alelos (i.e. haplótipos de polimorfismos) do *locus* estudado entre as formas clínicas, indicando que cepas parasitárias que apresentam polimorfismos nas posições 321 e 418 do locus estudado, formando o alelo CA, foram encontrados apenas em pacientes com LC, enquanto que o alelo AC, nas mesmas posições foi encontrado exclusivamente nos pacientes com LCA. Já o alelo CC parece ser capaz de produzir as duas formas da doença. O fato de pacientes com LC e LCA terem a mesma distribuição geográfica, demonstra que os habitantes da área endêmica estão sob mesmo risco de contrair as duas formas da doença, porém, como eles coabitam fazendas e pequenas vilas, mantendo inclusive, diferentes graus de parentesco torna menos plausível a possibilidade de influência ambiental na apresentação atípica desses pacientes. Portanto, existe uma

associação entre cepa de *L. (V.) braziliensis* e LCA, o que sugere que as cepas causadoras de LCA são distintas daquelas causadoras de LC, apesar de não haver distinção geográfica entre elas.

Conclusões

- Existem em Corte de Pedra três grupos de pacientes com LCA: gestantes, portadores da AIDS e pacientes sem fatores de risco aparente.
- Pacientes com LCA sem fatores de risco produzem menos IFN- γ e TNF- α e mais IL-10 e IL-17 que pacientes com LC quando comparados *in vitro*.
- Parasitos isolados de pacientes com LCA apresentam polimorfismos em proporções distintas dos isolados de pacientes LC.
- Os pacientes com LCA apresentam uma alta taxa de falha ao tratamento com antimonial, quando comparados com pacientes com LC.

Propostas de estudo

1. Avaliar as diferenças das populações de células nas lesões de pacientes com LCA e LC através de imunohistoquímica e microscopia confocal.
2. Ampliar a avaliação imunológica dos pacientes com LCA, com ênfase em nas citocinas imunomoduladoras.
3. Testar novos esquemas terapêuticos para pacientes com LCA, especialmente o uso da anfotericina B.
4. Avaliação fenotípica das cepas isoladas dos casos de LCA.

Referencias bibliográficas

- 1- Desjeux Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis* 2004 **27** 305–318
- 2- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005 Oct 29-Nov 4; 366(9496):1561-77.
- 3- Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983. **77**(5): 569-96.
- 4- Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2007 **102**(2): 149-153.
- 5- Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2007 2ª ed.
- 6- Datasus.gov [Internet]. Brazilian Ministry of Health, DATASUS. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>.
- 7- Neves LO, Talhari AC, Gadelha EP, Silva Júnior RM, Guerra JA, Ferreira LC, Talhari S. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol*. 2011 Nov-Dec;86(6):1092-101.
- 8- Walton BC. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Clinical aspects and control. Academic, London, p637. (The leishmaniasis in biology and medicine vol 2), 1987

- 9- Jones TC, Johnson WD Jr, Barreto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis.* 1987 **156**:73-83.
- 10- Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol.* 1995 **34**(7): 474-9.
- 11- Llanos Cuentas EA, Cuba CC, Barreto AC, Marsden PD. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **1984**; 78(6): 845-6.
- 12- Marsden PD, Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; **80**(6): 859-76.
- 13- Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalhi EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol* 2007 Nov-Dec; **73**(6): 843-7.
- 14- Costa JM, Netto EM, Marsden PD. Acute airway obstruction due to edema of the larynx following antimony therapy in mucosal leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1986 Apr-Jun; **19**(2): 109.
- 15- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002 Dec 15;186(12):1829-34.
- 16- Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 1994 **56** (4):315-25.

- 17- Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição Silva F, Modlin RL, Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest.* 1993 Apr **91** (4) 1390 – 5
- 18- Bonfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 1996 **84**:188-94.
- 19- Ribeiro de Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 1998 **31**:143-8
- 20- Scott P, Sacks D, Sher A. Resistance to macrophage-mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* 1983 **131**(2): 966-71.
- 21- Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SC, Coutinho SG Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996, **91**(2): 225-9.
- 22- Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med.* 1988 **168** (5):1675-84.
- 23- Sher A, Sacks DL, Scott PA. Host and parasite factors influencing the expression of cutaneous leishmaniasis. *Ciba Found Symp.* 1983, **99**: 174-89.
- 24- Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffman RL, Sher A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev.* 1989, **112**:161-82.

- 25- Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 2002 **70**: 6734-40.
- 26- Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol.* 2002, **12** (5):449-51.
- 27- Matta NE, Nogueira RS, Franco AM, de Souza E Souza I, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Leon LL, Da-Cruz AM. *Leishmania* (Viannia) *guyanensis* induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon Highland. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Mar;80(3):339-44.
- 28- Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun.* 2005, **73**(12):7853-9.
- 29- Machado P, Araujo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A, Carvalho EM. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Inf Dis* 2002 **34**(12):E69-73.
- 30- Unger A, O'Neal S, Machado PR, Guimarães LH, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Glesby MJ, Carvalho EM. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Apr;80(4):574-9.

- 31- Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis*. 2002, **34** (11):E54-8.
- 32- Schnorr D, Muniz AC, Passos S, Guimaraes LH, Lago EL, Bacellar O, Glesby MJ, Carvalho EM. IFN- γ production to leishmania antigen supplements the leishmania skin test in identifying exposure to *L. braziliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12):e1947
- 33- Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorfism in TNF genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1995, **182**: 1259-64.
- 34- Bittencourt AL, Rodrigues de Freitas LA. Diffuse cutaneous leishmaniasis. Anatomico-pathologic aspects. *Med Cutan Ibero Lat Am*. 1983. **11** (4):265-70.
- 35- Bryceson AD. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1970, **64**(3): 380-93.
- 36- Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca PM, Mendonça SC, Bertho AL, Soong L, McMahon-Pratt D, T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol*. 1996 Nov **84**(2) 144-5
- 37- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, Johnson Jr WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 1991 **44**:536-46.

- 38- Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun* 2004 **72**(1):508-514.
- 39- Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, de Jesus AR, Carvalho EM, Almeida RP. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis.* 2007 Feb **22**; 7:7.
- 40- Leopoldo PT, Machado PR, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, de Jesus AR, Ho JL, Guimarães LH, Bacellar O, Carvalho EM. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis.* 2006 Apr **25**;6:75.
- 41- Costa J Epidemiology of leishmaniasis in Brazil. *Gaz Méd Bahia* 2005, **75**: 3-17
- 42- Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1998, **59** (1):86-94.
- 43- El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH, Presber WH, Schönian G. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp Parasitol.* 2001, **97**(1):35-44.

- 44- Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1995 **53**(3): 256-9.
- 45- Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Mar;**86**(3):426-33.
- 46- Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhães AV, Barreto AC. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg.* 1986 **89**(6): 319-23.
- 47- Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1986, **154** (6):1003-11.
- 48- Ysmail-Dahlouk M, Amar Khodja A, Ysmail-Dahlouk S, Ait Belkacem F. Lupoid leishmaniasis. *Ann Dermatol Venereol* 1994, **121**(2): 103-6.
- 49- Ferahbaş A, Mistik S, Utaş S, Yaman O, Canoz O, Doganay M, Aşçıoğlu O. Cutaneous lupoid leishmaniasis: a case report. *Cutis.* 2006, **77**(1): 25-8.
- 50- Masmoudi A, Boudaya S, Ayadi N, Bouassida S, Khabir A, Meziou TJ. Clinical and histological study of lupoid cutaneous leishmaniasis (16 cases). *Presse Med.* 2007, **36**(12):1738-42.
- 51- Raja KM, Khan AA, Hameed A, Rahman SB. Unusual clinical variants of cutaneous leishmaniasis in Pakistan. *Br J Dermatol.* 1998, **139**(1): 111-3
- 52- Omidian M, Mapar MA. Chronic zosteriform cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2006, **72**(1):41-2.

- 53- Iftikhar N, Bari I, Ejaz A. Rare variants of Cutaneous Leishmaniasis: whitlow, paronychia, and sporotrichoid. *Int J Dermatol* 2003, **42**(10): 807-9.
- 54- Salmanpour R, Handjani F, Zerehsaz F, Ardehali S, Panjehshahin MR. Erysipeloid leishmaniasis: an unusual clinical presentation. *Eur J Dermatol*. 1999 Sep;9(6):458-9.
- 55- Momeni AZ, Aminjavaheri M. Clinical picture of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran. *Int J Dermatol*. 1994 Apr;33(4):260-5
- 56- Douba MD, Abbas O, Wali A, Nassany J, Aouf A, Tibbi MS, Kibbi AG, Kurban M. Chronic cutaneous leishmaniasis, a great mimicker with various clinical presentations: 12 years experience from Aleppo. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012 Oct;26(10):1224-9
- 57- Paradisi A, Capizzi R, Zampetti A, Proietti I, De Simone C, Feliciani C, Amerio PL. Atypical multifocal cutaneous leishmaniasis in an immunocompetent patient treated by liposomal amphotericin B. *J Infect*. 2005, **51**(5):e261-4.
- 58- Bongiorno MR, Pistone G, Aricò M. Unusual clinical variants of cutaneous leishmaniasis in Sicily. *Int J Dermatol*. 2009 Mar;48(3):286-9.
- 59- Saha M, Shipley D, McBride S, Kennedy C, Vega-Lopez F. Atypical cutaneous leishmaniasis in two patients receiving low-dose methotrexate. *Br J Dermatol*. 2006, **155**(4): 830-3.
- 60- Lopes L, Vasconcelos P, Borges-Costa J, Soares-Almeida L, Campino L, Filipe P. An atypical case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Portugal. *Dermatol Online J*. 2013 Nov 15;19(11):20407.
- 61- Lescure FX, Bonnard P, Chandenier J, Schmit JL, Douadi Y. Atypical cutaneous leishmaniasis. *Presse Med*. 2002, **16** ;31(6):259-61.

- 62- Convit J, Ulrich M, Pérez M, Hung J, Castillo J, Rojas H, Viquez A, Araya LN, Lima HD. Atypical cutaneous leishmaniasis in Central America: possible interaction between infectious and environmental elements. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005, **99**(1): 13-7.
- 63- Convit J, Ulrich M, Castillo J, De Lima H, Pérez M, Caballero N, Hung J, Arana B, Pérez P.. Inorganic particles in the skin of inhabitants of volcanic areas of Central America: their possible immunomodulatory influence in leishmaniasis and leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006, **100**(8): 734-9.
- 64- Calvopina M, Gomez EA, Uezato H, Kato H, Nonaka S, Hashiguchi Y. Atypical clinical variants in New World cutaneous leishmaniasis: disseminated, erysipeloid, and recidiva cutis due to *Leishmania* (V.) *panamensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2005, **73**(2): 281-4.
- 65- Abraham CM, Robles N, Palacios X et al. Celular immune response in patients with atypical cutaneous leishmaniasis. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter,* 1999, **15**:25-29.
- 66- Rodriguez B, Beatty R, Belli A, Barreto A, Palacios X, Marin F, Harris E. Atypical cutaneous leishmaniasis cases display elevated antigen-induced interleukin-10. *Parasite Immunol.* 2007, **29**(6):277-82.
- 67- Marsden PD, Almeida EA, Llanos-Cuentas EA, Costa JL, Megalhães AV, Peterson NE, Cuba CC, Barreto AC. *Leishmania braziliensis braziliensis* infection of the nipple. *Br Med J.* 1985, **290** (6466):433-4.
- 68- Costa JM, Vale KC, França F, Lago EL, Magalhães AV, Marsden PD, Sampaio RN. Leishmaniasis caused by *Leishmania viannia braziliensis* (Lvb). A case of atypical course. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1988, **21**(2): 71-3.

- 69- Bittencourt AL, Barral A, Costa JM, Saldanha AC, Badaró F, Barral-Netto M, Freitas LA. Diffuse cutaneous leishmaniasis with atypical aspects. *Int J Dermatol.* 1992, 31 (8):568-70.
- 70- Costa-Silva MF, Gomes LI, Martins-Filho OA, Rodrigues-Silva R, Freire Jde M, Quaresma PF, Pascoal-Xavier MA, Mendes TA, Serakides R, Zauli DA, Campi-Azevedo AC, Melo MN, Gontijo CM, Peruhype-Magalhães V, Teixeira-Carvalho A. Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. *Mol Immunol.* 2014 Feb;57(2):74-85.
- 71- Morgan DJ1, Guimaraes LH, Machado PR, D'Oliveira A Jr, Almeida RP, Lago EL, Faria DR, Tafuri WL, Dutra WO, Carvalho EM. Cutaneous leishmaniasis during pregnancy: exuberant lesions and potential fetal complications. *Clin Infect Dis.* 2007 Aug 15;45(4):478-82.
- 72- Thomaz-Soccol, V., G. Lanotte, J. A. Rioux, F. Pratlong, A. Martini-Dumas, and E. Serres. Phylogenetic Taxonomy of New World *Leishmania*. 1993, *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 68: 104-106.
- 73- Thomaz-Soccol, V., G. Lanotte, J. A. Rioux, F. Pratlong, A. Martini-Dumas, and E. Serres. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. 1993, *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 68: 107-108.
- 74- Saravia, N. G., I. Segura, A. F. Holguin, C. Santrich, L. Valderrama, and C. Ocampo. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania* (Viannia) in Colombia. 1998, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 86-94.
- 75- Saravia, N. G., K. Weigle, C. Navas, I. Segura, L. Valderrama, A. Z. Valencia, B. Escorcía, and D. McMahon-Pratt. Heterogeneity, geographic distribution, and

- pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. 2002, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 738-744.
- 76- Marsden, P. D., and T. C. Jones. 1985. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. Coordinating ed., E. Chang and R.S. Bary. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
- 77- Azulay, R. D., and D. R. Azulay Junior. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. 1995, *Int. J. Dermatol.* 34: 303-307.
- 78- Kahl, L.P., J.E. Byram, J.R. David, S.A. Comerford and F. Von Lichtenberg. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: comparative pathology of golden hamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Tres Bracos, Bahia, Brazil. 1991. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44: 218-232
- 79- de Oliveira, C.I., M.J. Teixeira, C.R. Teixeira, J.R. de Jesus, A.B. Rosato, J. Santa da Silva, C. Brodskyn, M. Barral-Netto and A. Barral. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. 2004. *Microbes and Infection* 6: 977-984.
- 80- Lucas, C. M., E. D. Franke, M. I. Cachay, A. Tejada, M. E. Cruz, R. D. Kreutzer, D. C. Barker, S. H. McCann and D. M. Watts. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. 1998. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 312-317.
- 81- Queiroz A, Sousa R, Heine C, Cardoso M, Guimarães LH, Machado PR, Carvalho EM, Riley LW, Wilson ME, Schriefer A. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. *J Clin Microbiol.* 2012 Dec; 50 (12): 4028 - 34.

- 82- Reed SG, Badaró R, Masur H, Carvalho EM, Lorenco R, Lisboa A, Teixeira R, Johnson WD Jr, Jones TC. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1986, **35** (1):79-85
- 83- Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol.* 2011 Nov;49(11):3892-904.
- 84- Cordero FA. American leishmaniasis; report of a case with unusual mucocutaneous lesions. *Arch Derm Syphilol.* 1950 Sep;62(3):425-30.
- 85- Da-Cruz AM, Filgueiras DV, Coutinho Z, Mayrink W, Grimaldi G Jr, De Luca PM, Mendonca SC, Coutinho SG. Atypical mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in an acquired immunodeficiency syndrome patient: T-cell responses and remission of lesions associated with antigen immunotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999 Jul-Aug;94(4):537-42
- 86- Castro GAL, Ponce C, Ponce E, Sierra M. Characterization of patients with atypical cutaneous leishmaniasis. *Rev Med Hondur.* 2008 78: 101-7
- 87- Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, Cardoso TM, Ramasawmy R, Oliveira WN, Schriefer A, Carvalho EM. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. *Parasite Immunol.* 2011 Feb;33(2):132-6.
- 88- Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho DC, Filho AC, Barral A, Coffman RL, Carvalho EM. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1999 Nov;180(5):1731-4.

- 89- Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimarães LH, Jesus AR, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol*. 2006 Jan; 63(1):70-8.
- 90- Faria DR, Souza PE, Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, Dutra WO. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2009 Aug;31(8):432-9.
- 91- Santos Cda S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, Costa J, Borges VM, de Oliveira CI, Van Weyenbergh J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol*. 2013 Jun;133 (6):1533-40.
- 92- Brodskyn CI, Barral A, Bulhões MA, Souto T, Machado WC, Barral-Netto M. Cytotoxicity in patients with different clinical forms of Chagas' disease. *Clin Exp Immunol*. 1996 Sep;105(3):450-5.
- 93- Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun*. 2005 Dec;73(12):7853-9.
- 94- de Oliveira CI, Brodskyn CI. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol*. 2012 Jun 8;3:145
- 95- Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, Carvalho LP, Glennie ND, Passos S, Carvalho EM, Scott P. Human classical monocytes control the intracellular

- stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *J Infect Dis.* 2014 Jan 7.
- 96- Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathogenesis* 38 (2005) 147–160
- 97- Machado PR, Rosa ME, Costa D, Mignac M, Silva JS, Schriefer A, Teixeira MM, Bacellar O, Carvalho EM. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011 Aug;105(8):438-44.
- 98- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1133-41.
- 99- Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, Scott P, Carvalho EM. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2009 Jul 1;200(1):75-8.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Projeto: O PAPEL DO POLIMORFISMO DA *Leishmania braziliensis* NO DESFECHO CLÍNICO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTARES POR ESTES PARASITOS.

Objetivo do Projeto: Uso de marcadores polimórficos de DNA randomicamente amplificados ("Randomly amplified polymorphic DNA", RAPD) e tipagem de *loci* baseada em sequenciamento ("Multilocus sequence typing", MLST) para distinguir cepas de *Leishmania braziliensis* envolvidas com doença humana em Corte de Pedra.

Nome do paciente:

Investigador Principal: Albert Schriefer, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

Comitê de Ética: Maternidade Climério de Oliveira/UFBA-Rua Padre Feijó 240, Ambulatório Magalhães Neto, 3º andar, Canela-Salvador-Bahia.

Nº do Projeto:

Convite e Objetivo:

Você é convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm diferentes formas de leishmaniose. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado (a) assinar este formulário de consentimento.

Participação voluntária: A sua participação é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento. Caso, após aceite participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da leishmaniose (Glucantime®).

Finalidade do estudo: Este estudo vai estudar se as leishmanias causadoras das diferentes formas de leishmaniose são iguais ou diferentes. Para isto obteremos as leishmanias responsáveis por sua doença em material da ferida, pela retirada de um pequeno pedaço da sua pele e por aspiração da borda da ferida.

Procedimentos: Caso você concorde em participar do estudo, os procedimentos para obtenção das leishmanias serão os mesmos realizados para o diagnóstico normal em doentes não participantes do estudo. Ou seja, além de ser examinado por um médico clínico, será realizada biópsia e aspirado da lesão, bem como teste intradérmico, e tirados 5 ml de sangue para sorologia, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença. A retirada do pedaço da pele ou da ferida do nariz para diagnóstico da sua doença será feita com anestesia para você não sentir dor. Uma parte deste material de biópsia e do material de aspirado será usada para o diagnóstico e a outra para os estudos sobre a leishmania. Caso o diagnóstico de leishmaniose não seja confirmado, todo o material obtido para a pesquisa será destruído.

Análise do material biológico. Uma parte do material coletado durante a biópsia e a aspiração feitas em sua ferida servirá para o estudo da leishmania. Serão empregados dois testes com o objetivo de caracterizar geneticamente a leishmania que está causando a sua doença e depois compará-la com as leishmanias que estão causando doença nas outras pessoas desta região. Para um dos testes, o RAPD (DNA polimórfico randomicamente amplificado) o aspirado e a biópsia triturada serão colocados num líquido especial que permite o crescimento da leishmania. Depois da leishmania crescida, ou seja,


Claudia Albuquerque Dias
Secretaria Administrativa
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/MCO/UFBA

multiplicada, será extraído o DNA dela. É este DNA que será caracterizado pelo RAPD. O resultado desta caracterização se chama genótipo. Finalmente, os genótipos das leishmanias de outros pacientes desta região serão comparados com o genótipo da que está causando a sua doença. O outro teste se chama MLST (Tipagem de loci baseada em sequenciamento). Ele também tem como objetivo identificar os genótipos das leishmanias. No MLST não é necessário crescer a leishmania antes de se fazer o teste, ele pode ser realizado diretamente na biópsia e no aspirado. O RAPD e o MLST serão realizados em conjunto com o objetivo de confirmar os resultados e também de torná-los mais precisos.

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento e confirmação do diagnóstico sua participação no estudo acabará em 2 ou 3 dias. Todo mês você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização de nova série de Glucantime® ou de outra medicação, que também lhe será fornecida gratuitamente. Isto não faz parte do estudo.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica. Você ou qualquer participante desse estudo não será identificado por nome nas publicações dos resultados do estudo.

Análises de riscos e benefícios: O tratamento que você receberá (Glucantime®) é semelhante ao que todos os pacientes receberão, participando ou não do estudo. Não existe nenhum procedimento adicional para os participantes do estudo, assim não existe também nenhum risco adicional para você. De qualquer forma o risco de hemorragia ou infecção durante as biópsias e aspirados de lesão serão minimizados pela limpeza extensa da superfície mucosa ou cutânea das lesões com anti-sépticos antes dos procedimentos, pelo uso de instrumentos e materiais estéreis, e aplicando-se pressão com gaze nos locais onde foram realizados os procedimentos para estancar o sangramento. Materiais descartáveis serão usados em todos os procedimentos. O risco de reflexo vago-vagal será minimizado realizando-se os procedimentos com você deitado. Você também deverá se alimentar antes do procedimento para evitar tonturas ou perda transitória da consciência por causa do reflexo vago-vagal. Também será reservado um leito que você poderá usar para repousar e se recuperar caso sinta tonturas durante os procedimentos. Quaisquer reações adversas que você apresente devido ao teste cutâneo de Montenegro serão tratadas com pomadas anti-inflamatórias de corticosteróides (hidrocortisona 1%) no momento da leitura do exame (48 a 72 horas após a aplicação). Em caso de reação adversa ao teste de Montenegro você também receberá pomada adicional para que em casa você possa passá-la na pele, no local do teste três vezes ao dia por 3 a 5 dias, conforme necessário.

Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade: Pode não haver qualquer benefício pessoal para você, como consequência de sua participação neste estudo. Contudo, nós esperamos que, no futuro, a sociedade possa se beneficiar deste estudo por ele resultar numa melhor compreensão desta doença parasitária freqüente, que poderá, inclusive, ajudar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento.

Custos: Você não terá custos com o tratamento com antimônio ou com outra droga para tratamento da leishmaniose caso haja necessidade de uso. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contatar um dos seguintes investigadores pelo telefone (71) 3237-7353: Dr. Albert Schriefer, Dr. Edgar M. Carvalho, Dr. Paulo Machado e Dr. Luiz Henrique Guimarães. Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgar Santos, através do endereço que encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone (71) 3247-4634.


Claudia Albuquerque Dias
Secretaria Administrativa
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/IMCOP

Consentimento: Eu li ou leram para mim as informações deste termo de consentimento livre e esclarecido acima. O Dr. Schriefer ou um representante dele explicou o estudo para mim e respondeu a todas as minhas dúvidas. Me foram listados também os riscos e incômodos a que serei submetido, bem como os possíveis benefícios gerados por este estudo.

Também me foi dito que eu não tenho que tomar parte deste estudo e que eu posso me recusar a participar a qualquer momento.

A equipe médica do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos estará disponível para quaisquer cuidados médicos que se mostrem necessários devido a injúrias resultantes da minha participação neste estudo. Além do mais, o Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, ou o patrocinador do estudo, cobrirá quaisquer despesas resultantes de cuidados médicos relativos à minha participação neste estudo.

Os meus direitos como participante da pesquisa me foram esclarecidos e eu, voluntariamente, consinto na minha participação no estudo. Me foram esclarecidos o estudo e as razões de sua realização. Eu receberei uma cópia assinada deste termo de consentimento livre e esclarecido para arquivar, como documentação da minha participação como voluntário neste estudo.

Assinatura ou impressão do participante

Data

Assinatura ou impressão do responsável* / Data

Nome do responsável*

Assinatura ou impressão da testemunha / Data

Nome da testemunha

*Requerido apenas se o participante não for competente para tomar decisões

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

Eu discuti os pontos acima com o participante do estudo ou seu representante legal. É da minha opinião que o participante entende os riscos, benefícios e obrigações envolvidos em sua participação neste projeto de pesquisa.

Assinatura do investigador


Claudia Albuquerque Dias
Secretaria Administrativa
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/IMCQ/UFBA

Artigo em processo de submissão:

Atypical lesions in tegumentary leishmaniasis: A systematic review of its possible causes and therapeutic management.

Guimaraes L.H.*; Schriefer A*+.

*Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil; *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Infecciosas (INCT-DT), Brasil; +Departamento de Ciências da Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Brasil.

Introduction

Tegumentary Leishmaniasis (TL) is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which are transmitted to humans by sand flies of the family *Psychodidae* and present worldwide distribution. The World Health Organization (WHO) estimates that 1.5 million new TL cases occur per year and about 350 million people are at risk globally (Desjeux 2004). The most frequent form of the disease is the localized cutaneous leishmaniasis (LCL) that presents as an ulcerated lesion with raised edges and affects exposed areas of the body surface (Murray 2005). There are also less common but already well characterized forms like mucosal leishmaniasis (ML), disseminated cutaneous leishmaniasis (DCL), diffuse leishmaniasis (DL) and post-kalazar dermal leishmaniasis (PKDL). ML is characterized by the presence of lesion(s) in nasal and/or pharyngeal mucosa (Lessa 2007). DCL is characterized by the presence of 10 or more ulcerated and acneiform lesions in different areas of the patient's body (Carvalho 1994; Turetz 2002). DL is characterized by presence of nodular not ulcerated lesions, with poor or absence immune response (Bonfim 1996), while PKDL presents as a complication after treatment of visceral leishmaniasis and is characterized by macular, papular, or nodular lesions in the skin (Mukhopadhyay 2014).

Besides the well established rare forms like DL and PKDL, other unusual presentations do occur and consist in challenges for both proper and timely diagnosis and treatment of TL. These atypical presentations usually have little or no resemblance to classic forms of cutaneous leishmaniasis. The aim of this systematic review was to consolidate the current knowledge about these atypical forms of TL, their postulated causes and the treatment regimens applied in these cases.

Methods

We followed the recommendations of the PRISMA - Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta - Analyses (Moher 2009) to identify papers relevant to the theme. There was no time limit for inclusion, and articles in Portuguese, English and Spanish were selected. The sources of literature searched were MEDLINE, LILACS, COCHRANE and SCIELO. The keywords used were leishmaniasis, atypical, unusual, non-classical and aberrant. We excluded studies about visceral leishmaniasis and

atypical localization of classic lesion, and the articles were categorized in relevant or irrelevant to the purpose of the review. Every article classified as relevant was thoroughly read to confirm its relevance. Some articles despite the effort, including direct contact with the author, were not accessible and were excluded from the study. The following data were manually extracted from each manuscript and compiled in a table using Excel version 2010 software (Microsoft Corp., USA): authors, year of publication, type of study (case report, case series and case-control), country of patients' origin, duration of disease, parasite species isolated, cause proposed to explain atypical presentation, treatment used in the case, and response to treatment.

Results

The search flow charted in Figure 1 resulted in the recovery of 443 papers, selected after exclusion of duplicates. Of these, 310 were excluded after reading the title and abstract, leaving a total 133 potentially relevant articles. We could not obtain access to five of the articles, even trying direct contact with the authors and/or publishers. After reading the full texts, 67 articles were excluded because they did not contain information regarding the purpose of this review, yielding 61 articles from which the information were extracted and analyzed.

The number of atypical cutaneous leishmaniasis case is low annually, with the average in 3 papers, with a peak in 2008 – 2009 with 7 reports. The first description of an atypical lesion in the four searched databases consisted of a 1950 (Cordero 1950). which unfortunately could not be retrieved, as was the case for many of the older articles. In more than half of the articles effectively used in this review (n=32, 52.4%) the atypical presentation was not attributed to a specific cause. When a putative cause was cited (n=29, 47.6%), most frequently it consisted of concurrent acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) caused by human immunodeficiency virus (HIV), which was referred to in 13 papers (21.3%), followed by other causes of host immune status variation like immunosuppression due to organ transplantation and autoimmune diseases 5 (8.2%), and parasite strain (n=3, 4.9%). The following potential causes for the atypical presentations have also been suggested in fewer reports: pregnancy, trauma, kidney failure, malnutrition, diabetes and environmental factors.

Thirty eight of the selected articles were case reports, 22 were case series, and one was a case-control study. The majority (n=37, 60%) of the reports originated in the Old World, with Italy (n=8, 13.1%) being the country with the greatest number of reports in Europe, followed by Spain, Turkey, Cyprus, Germany and England, respectively. Pakistan (n=6, 9.8%) was the country with most reports in Asia followed by India, Iran, Afghanistan, Bhutan, Syria and Saudi Arabia, respectively. African countries that also reported atypical cases were Tunisia, Burkina Faso, Morocco, Nigeria and Ethiopia. In the New World, the country presenting the largest number of reports of atypical leishmaniasis cases was Brazil (n=11, 18%) followed by Honduras, Nicaragua, Mexico, Belize, Colombia, Ecuador and Costa Rica, respectively. The median time between lesion

development and disease diagnosis was 22 weeks, ranging from 3 weeks to 470 weeks (nine years).

Regarding the parasites, over a third of the reports (n=23, 37.7%) did not identify the species causing the atypical lesions. The most frequent *Leishmania species* reported were *L. infantum* (n=10, 16.4%), *L. chagasi* (n=8, 13.1%), *L. major* (n=6, 9.8%) and *L. braziliensis* (n=5, 8.2%). However to a lesser extent *L. tropica*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. panamensis* and *L. amazonensis* were also isolated from the reported atypical cases.

The leishmaniasis treatments used in patients with atypical lesions were not described in 15 (24.6%) articles. In papers that described treatment, the most commonly used anti-leishmanial drug was antimony (n=30, 49.2%), which was administered either intralesionally, or intramuscularly, or intravenously, singly or in combination with other drugs such as allopurinol, itraconazole, and ketoconazole. Combination of antimony with local cryotherapy was also reported. The second most commonly used drug in the reports was amphotericin (n=9, 14.7%), administered intravenously either in liposomal or in deoxycholate formulations. Other single therapies reported for treating the atypical cases were cryotherapy, ketoconazole, and miltefosine. The response to therapy was not mentioned in 13 (21.3%) articles. When cited, use of antimony resulted in patients cure in 22 (36%), and failure in 8 (13.1%) reports. Close to 85% (n=11) of the atypical cases reported to present concurrent AIDS did not respond to the first treatment, which consisted of antimony in 5, amphotericin in 4, and fluconazole in 1 report. In the remainder two cases reported with concurrent AIDS, one was successfully treated for atypical cutaneous leishmaniasis using antimony, while the other received ketoconazole, but could not be followed-up to ascertain efficacy of the treatment.

Discussion

Atypical variants of diseases constitute diagnostic and therapeutic challenges even to well-trained health care professionals working in regions endemic for the disorders. We considered as atypical any case, series or group of individuals reported to present a confirmed clinical picture of tegumentary leishmaniasis departing from all usual definitions of the disease. Despite the definition of atypical be somewhat subjective, the clinical picture is described as classic ulcerated lesions with infiltrated borders and rigorous frameworks that differ from this description may be considered atypical. Vegetative lesions, crusty, sporotrichoid, (figure 2) not recall the classic diagnosis of leishmaniasis and may be confused with other infectious diseases and even neoplasia. Our intent was to summarize the palette of atypical presentations, as well as to consolidate the authors' elaborations on its possible reasons and their experiences in treating such condition.

The majority articles consolidated in this review come from countries with endemic cutaneous leishmaniasis. Only a few case reports herein employed originated from countries that do not present the entire transmission cycle of *Leishmania sp* (i.e. England and Germany). In such descriptions the authors elaborate that the patients were exposed

to the parasites during their lifetime while visiting regions in which they are endemic. In general these cases also presented concurrent drug induced or AIDS related immunosuppression. Furthermore, there was a variation in the number of articles describing atypical cutaneous leishmaniasis overtime, which may reflect a seasonal variation in the number of cases or to a great extent the interest of the scientific community on the impact of the AIDS pandemic on other diseases, including leishmaniasis, but which may also have been triggered to a large extent by the progressive realization about the underlying complexity of leishmaniasis differential diagnosis and management.

Other causes of changes in the immune status of the leishmaniasis patients have also been implicated as possible causes of atypical lesions, including use of immunosuppressive drugs for organ transplantation and autoimmune diseases treatment, comorbidities like diabetes mellitus and malnutrition, and pregnancy. In this last regard, it has been shown that the immune response to leishmania antigen switches temporarily to a more Th2 type during pregnancy, which is accompanied by the uncommon presentation of the cutaneous leishmaniasis (Morgan 2007). However delivery results in restoration of the Th1 response to leishmania and often also self-healing of lesions (Wegmann 1993). The increasing global burden of diabetes mellitus (Wild 2004) makes it an important disease status changer variable to be continuously taken into consideration given the immune and metabolic effects it causes (Knapp 2013), and the several accounts of its interference with an array of clinical syndromes (Joshi 1999). However at this point the suggestion that diabetes may be consistently related to atypical lesions in leishmaniasis requires stronger epidemiological evidence. Only a single report of three cases of diabetes mellitus patients with atypical leishmaniasis lesions was found in our search of the literature.

The fact that even factors not related to the host were also enlisted as possible causes of atypical cutaneous leishmaniasis reinforces the expectations of its complex etiology. The evolving molecular epidemiology tools have been helping shed light into the effects of parasite polymorphism and disease outcomes (Schriefer 2004), and in this review 61 papers related polymorphism of *Leishmania sp* to atypical presentations of the disease. On the other hand, even hard to pick candidates as volcanism have been reported as a possible cause of atypical lesions underscoring that environment needs also to be taken into consideration , albeit such factors should be expected to be more variable from place to place, and could tend to be more elusive from the grasp of investigators.

Altogether *L. infantum*, considered as mentions to both *L. infantum* and *L. chagasi*, was the species most frequently involved with atypical cases, which may reflect a wide distribution of this species in the world. On the other hand, the number of atypical cases may be underreported in regions of other species.

The treatments of atypical lesions did not differ substantially from those used for tegumentary leishmaniasis overall. Antimonies remain the most widely used drug for the

treatment of cutaneous leishmaniasis, and was the most reported for atypical cases in this review. The association of two antileishmanial drugs was also reported, and was probably based on the fact that atypical lesions may correlate with disease severity and treatment failure (Guimarães 2009). Another sound reason for combination therapy is atypical presentation of tegumentary leishmaniasis concurrent with immunosuppression (Saha 2006, Simon 2011). The use of local treatments such as cryotherapy and intralesional injection, used in cases when the lesions are single or small numbers and in pregnant women (Douba 2011), should be viewed with caution, particularly against species like those of the subgenus *Viannia*, which are tend to be involved with dissemination of disease (i.e. lesions distant from the primary focus). The treatment of patients with AIDS / coinfection leishmaniasis keeps antimonial as first line and the response is satisfactory, besides the risk of recurrence (Cruz 2006).

Leishmaniasis is a complex disease with many factors involved in its pathogenesis, like the genetics, immune and nutritional status of the host, concurrence of morbidities, parasite species and strain, and probably even factors related to the environment and to vectors. The several reports herein summarized offer a palette of hypotheses for the pathogenesis of atypical tegumentary leishmaniasis. However stepping forward to analytical case control studies is necessary to identify risk factors to these less common presentations, as well as evaluate their homogeneity as a clinical syndrome and elaborate more robust hypotheses on their pathogenesis. Ideally, such studies should focus both in the host and the infecting parasites.

References:

1. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis* 2004 27 305–318
2. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1561-77.
3. Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2007 Nov-Dec;73(6):843-7.
4. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*. 1994 56 (4):315-25

5. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002 186 (12): 1829-34
6. Bonfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 1996 84:188-94.
7. Mukhopadhyay D, Dalton JE, Kaye PM, Chatterjee M. Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery. *Trends in Parasitology* February 2014, Vol. 30, No. 2
8. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ* 2009; 339: b2535.
9. Cordero FA. American leishmaniasis; report of a case with unusual mucocutaneous lesions. *Arch Derm Syphilol.* 1950 Sep;62(3):425-30.
10. Morgan DJ, Guimaraes LH, Machado PR, D'Oliveira A Jr, Almeida RP, Lago EL, Faria DR, Tafuri WL, Dutra WO, Carvalho EM. Cutaneous leishmaniasis during pregnancy: exuberant lesions and potential fetal complications. *Clin Infect Dis.* 2007 Aug 15;45(4):478-82.
11. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mossmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14:353–5.
12. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27:1047–1053.

13. Knapp S. Diabetes and infection: is there a link?--A mini-review. *Gerontology*. 2013;59(2):99-104.
14. Joshi N, Caputo GM, Weitekamp MR, Karchmer AW. Infections in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1999 Dec 16;341(25):1906-12.
15. Schriefer A, Schriefer AL, Goes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, et al. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun* 2004 72(1):508-514.
16. Guimarães LH, Machado PR, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Carvalho EM. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009 Jul;103(7):712-5.
17. Saha M, Shipley D, McBride S, Kennedy C, Vega-Lopez F. Atypical cutaneous leishmaniasis in two patients receiving low-dose methotrexate. *Br J Dermatol*. 2006, 155(4): 830-3.
18. Simon I, Wissing KM, Del Marmol V, Antinori S, Rimmelink M, Nilufer Broeders E, Nortier JL, Corbellino M, Abramowicz D, Cascio A. Recurrent leishmaniasis in kidney transplant recipients: report of 2 cases and systematic review of the literature. *Transpl Infect Dis*. 2011 Aug;13(4):397-406.
19. Douba MD, Abbas O, Wali A, Nassany J, Aouf A, Tibbi MS, Kibbi AG, Kurban M. Chronic cutaneous leishmaniasis, a great mimicker with various clinical presentations: 12 years experience from Aleppo. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012 Oct;26(10):1224-9.

20. Da-Cruz AM, Rodrigues AC, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Sabbaga-Amato V, Posada MP, Lindoso JA, Goto H. Immunopathologic changes in HIV-Leishmania co-infection. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39 Suppl 3:75-9.

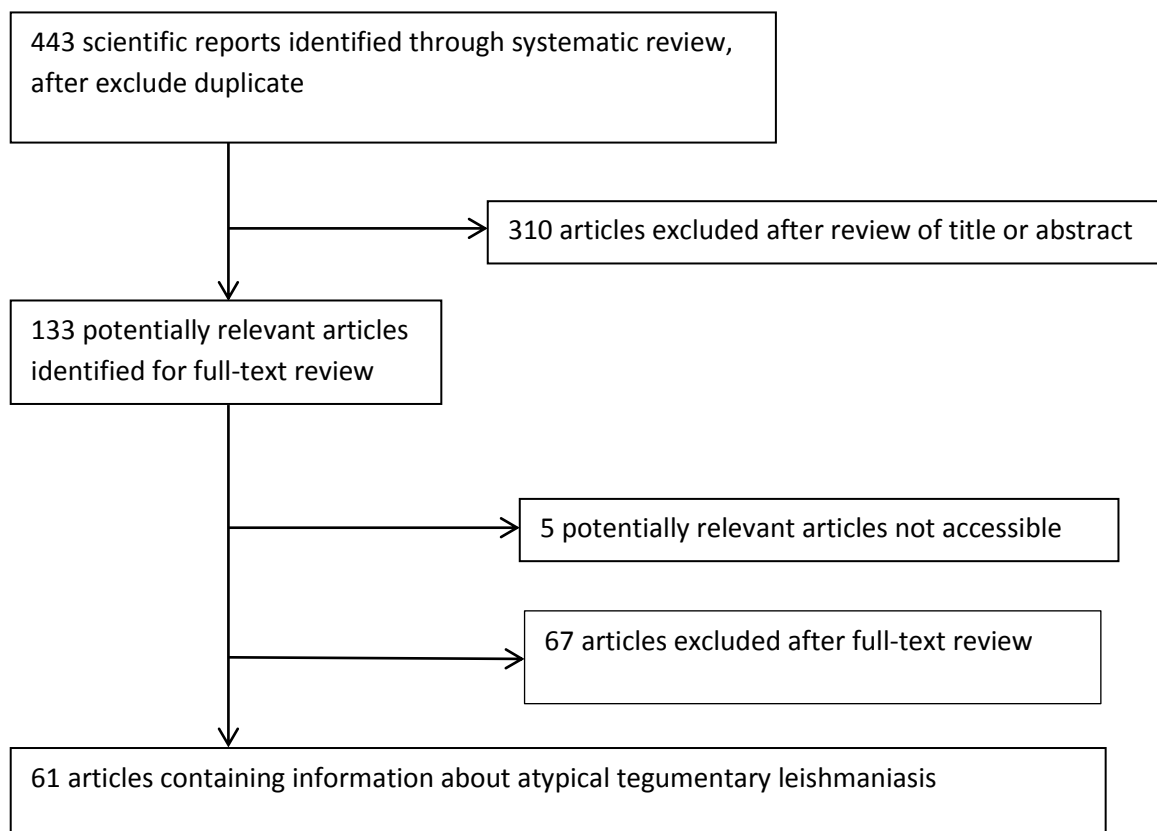
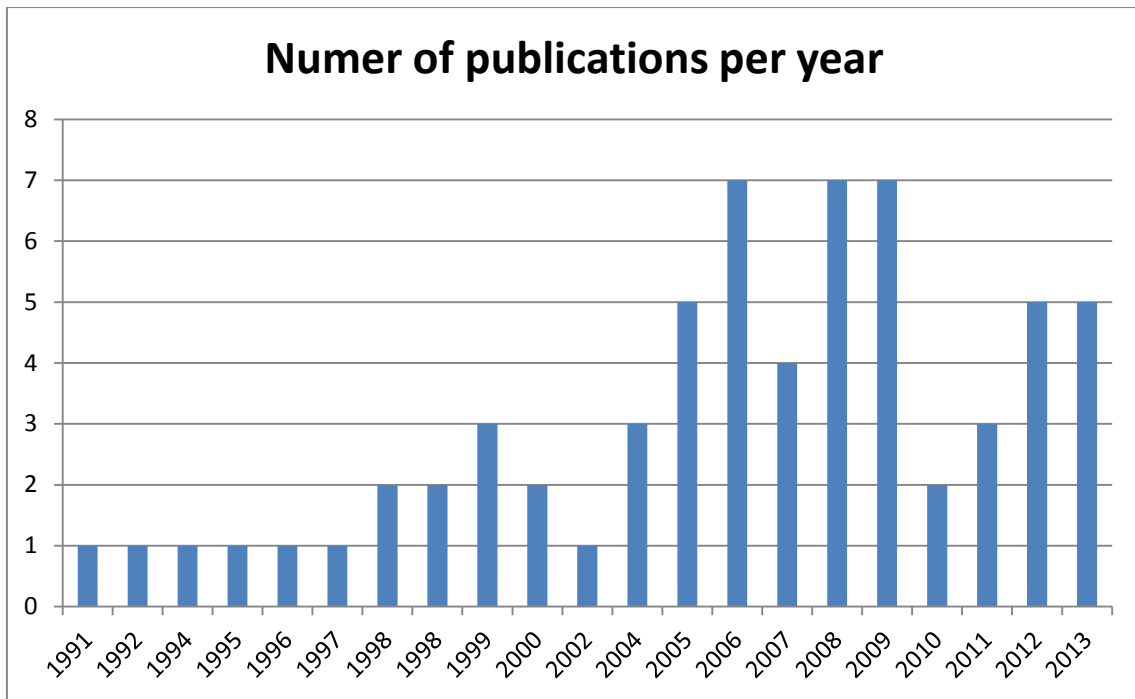


Figure 1 Flowchart selection of articles



Graphic 1. Number of publications per year over 22 years.



Figure 2. Samples of atypical lesions of tegumentary leishmaniasis: infiltrative, vegetative and sporotrichoid-like respectively. (Photos by the author's)